

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen
und ihre Funktion als Katalysatoren des
spezifischen Wasserstofftransfers
zwischen Steroidhormonen
in Humanplacenta

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Sokolowski
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0012

Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen
und ihre Funktion als Katalysatoren des
spezifischen Wasserstofftransfers
zwischen Steroidhormonen
in Humanplacenta

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Sokolowski
aus Berlin

Referent: Professor Dr. Dr. Ernst Schütte

Korreferent: Professor Dr. D. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am 22. September 1976



Ich danke Herrn Dr. med. Kunhard Pollow für die Überlassung
des Dissertationsthemas und für die hilfreiche Unterstützung
bei der Anfertigung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte, o. Prof., danke ich für
großzügige Unterstützung und wertvolle Hinweise.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	6
2.	Material und Methodik	10
2.1.	Steroide	10
2.2.	Substanzen	10
2.3.	Aufarbeitung des Placentagewebes	11
2.3.1.	Differentialzentrifugation	11
2.3.2.	Zonalzentrifugation	12
2.3.3.	Mitochondrien-Subfraktionierung	13
2.4.	Reinigung und Anreicherung der intramitochondralen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen	14
2.4.1.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	14
2.4.2.	Agarose-Gelchromatographie an BioGel A-0,5 m	14
2.4.3.	DEAE-Ionenaustauschchromatographie	14
2.4.4.	Isoelektrofokussierung in einer 110-ml-Säule	15
2.4.5.	Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-Gelen	15
2.5.	Enzymaktivitätsbestimmungen	17
2.5.1.	17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität	17
2.5.2.	20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität	17
2.5.3.	Messung der "Transhydrogenase-Aktivität"	17
2.6.	Aufarbeitung der Inkubationsansätze	18
2.7.	Bestimmung der Leitenzyme	19
2.8.	Bestimmung von DNS und RNS	19
2.9.	Proteinbestimmung	19
2.10.	Elektronenmikroskopie	19
2.11.	Phospholipoidbestimmung	20
2.11.1.	Gesamtphospholipoid	20
2.11.2.	Bestimmung der Einzelphosphatide	20
2.12.	Molekulargewichtsbestimmung	20
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Zellfraktionierungsstudien	21
3.1.1.	Subfraktionierung der Mitochondrien-Rohfraktion	22
3.1.2.	Subfraktionierung der zweimal gewaschenen Mikro- somen-Fraktion	23
3.1.3.	Elektronenoptische Kontrollen	25
3.1.4.	Zonalzentrifugation vorgereinigter Humanplacenta- Mitochondrien	26

3.2.	Ergebnisse der Isolierung, Anreicherung und Ausbeute der mitochondrialen 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen	27
3.2.1.	Ammoniumsulfatfällung	28
3.2.2.	Agarose-Gelfiltration	28
3.2.3.	DEAE-Sephadex-Säulenchromatographie	29
3.2.4.	Säulenelektrofokussierung	29
3.2.5.	Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-Membranen	30
3.3.	Untersuchung der Einflußname von Detergentien auf die strukturgebundenen Enzymaktivitäten der Humanplacenta-Mitochondrien	31
3.4.	Kinetische Untersuchungen mit den solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen	33
3.4.1.	Abhängigkeit von der Menge des Enzymproteins	33
3.4.2.	Zeitabhängigkeit	33
3.4.3.	Thermische Inaktivierung	33
3.4.4.	Temperaturoptimum	34
3.4.5.	pH-Optimum	34
3.4.6.	Untersuchungen zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des 17 β - und 20 α -Enzyms	36
3.4.7.	Substratspezifität	36
3.4.8.	K _m -Wert-Bestimmung und Coenzym-spezifität	37
3.5.	Einfluß von Phospholipiden auf die Enzymaktivitäten	39
3.6.	Molekulargewichtsbestimmung	40
3.7.	Untersuchungen zum Wasserstofftransfer zwischen der 17-Position von Östradiol-17 β und der 20-Position von Progesteron	41
3.7.1.	Rekombinationsverhalten der aus der "Außenmembran" von Humanplacenta-Mitochondrien isolierten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen	42
3.7.2.	pH-Wert-Abhängigkeit der "Transhydrogenase-Aktivität"	43
3.7.3.	Substratspezifität der "Transhydrogenase-Aktivität"	44
4.	Diskussion	45
4.1.	Subzelluläre Verteilung der 17 β - und 20 α -Enzyme in der Humanplacenta	45

4.2.	Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und Charakterisierung der mitochondrial gebundenen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen	46
4.3.	Zur Frage der biologischen Bedeutung des Wasserstofftransfers zwischen C-17 von Östradiol-17 β und C-20 von Progesteron in verschiedenen Enzympräparationen der Humanplacenta-Mitochondrien	49
5.	Zusammenfassung	52
6.	Literaturverzeichnis	54
	Lebenslauf	58

1. Einleitung

Eine hochentwickelte organisch-chemische und physikalisch-chemische Methodik ermöglichte die Reindarstellung, die Aufklärung des molekularen Aufbaus und die Synthese von in tierischen und bakteriellen Organismen natürlich vorkommenden Steroidhormonen. Die physiologische Bedeutung dieser Substanzen für die Regulation enzymatisch regulierter Stoffwechselvorgänge und für die Merkmalsprägung im wachsenden Organismus (z. B. äußere Geschlechtsorgane, Brustsprossung, Geschlechtsbehaarung, Körperbau usw.) ist bekannt. Durch Derivatbildung natürlich vorkommender Steroidhormone wurde ein Weg eröffnet zur Erforschung ihrer pharmakologischen Eigenschaften. In der klinischen Routinediagnostik wird die Fähigkeit der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Steroiden in biologischem Material ausgenutzt zur Analyse der Pathogenese endokriner Erkrankungen. In der klinischen Therapie nehmen Steroide in einem breitgefächerten Spektrum von Krankheitsbildern einen zentralen Platz ein, beispielsweise bei der Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, bei akuten Schock- und Stress-Situationen, bei malignen Systemerkrankungen, bei der Substitution natürlicher Steroidhormone beim Ausfall endokriner Drüsen, bei männlichen und weiblichen Genitalorgan-Karzinomen und bei vielen anderen Krankheitsbildern.

Dieser Feststellung steht die Tatsache gegenüber, daß bis heute die biochemischen und molekularen Aspekte des Wirkungsmechanismus der Steroidhormone noch weitgehend unbekannt sind. Die Anstrengungen, die von zahlreichen Arbeitsgruppen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus unternommen wurden, sind verständlicherweise geprägt von den jeweils in der Biochemie vorherrschenden Arbeitsrichtungen. Im Mittelpunkt der Überlegungen steht das Phänomen, daß nach hormoneller Stimulation in vielen "Target"-Organen ein Anstieg verschiedener zellspezifischer Proteine bzw. Enzymaktivitäten beobachtet werden kann.

Im folgenden soll kurz auf die eingeschlagenen Wege, die zur Lösung der Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Steroidhormone beschritten wurden, eingegangen werden.

a) Steroidhormone aktivieren in der Zelle vorhandene Enzymmoleküle auf der Basis der allosterischen Veränderung, wie es von Koshland (1) vorgeschlagen wurde. Tomkins und Mitarbeiter (2) fanden, daß Östrogene die kristalline Glutamatdehydrogenase in Untereinheiten zerlegen, die die Alaninoxidation katalysieren.

b) Steroidbedingte de-novo-Synthese von zellspezifischen Proteinen (z. B. Ovalbumin, Avitin) und Enzymproteinen durch "Stimulierung" des Proteinsyntheseapparates. Ein Beispiel der Neubildung eines Enzyms aus kleineren Untereinheiten lieferten schon 1956 Knox und Mitarbeiter (3,4) mit dem Nachweis, daß β -Cortisol einen Aktivitätsanstieg der Tryptophanpyrrolase in der Rattenleber bewirkt als Folge einer spezifischen de-novo-Synthese dieses Enzyms. Untersuchungen neueren Datums, die sich an der meßbaren Stimulierung der RNS-Synthese unter dem Einfluß von Steroidhormonen in bestimmten "Target"-Organen orientieren, interpretieren die Steroidhormonwirkung als hormonelle "Genaktivierung". Diese vor etwa 12 Jahren von Jensen und Mitarbeitern (5,6) initiierte Arbeitsrichtung läßt sich unter dem Oberbegriff "Rezeptorchemie" zusammenfassen. Das im Rahmen der "Rezeptorchemie" entwickelte Konzept hat zum Inhalt, daß das in die "Target"-Zelle einfließende Steroidhormon an ein spezifisches Proteinmolekül gebunden und als Rezeptor-Steroid-Komplex in den Kern transloziert wird. Beim Durchwandern der Kernmembran wird in einem energieabhängigen Prozeß ein Teil des Rezeptormoleküls abgestreift. Der modifizierte Rezeptor-Steroid-Komplex assoziiert anschließend mit spezifischen Chromatinbezirken des "Target"-Zellkerns, die von einigen Autoren als sogenannte "nicht-histone" saure Kernproteine erkannt wurden. Dieser Prozeß wirkt als "Initialzündung" und setzt durch Konformationsänderung eines Kernproteins, das einen bestimmten DNS-Bezirk maskiert, "Template"-Aktivitäten frei, die die Transkription einer spezifischen m-RNS zur Folge haben. Die mit kurzen Worten geschilderten Aspekte der "Rezeptorchemie" stellen die von vielen Arbeitsgruppen heute unter molekularbiologischen Vorzeichen vorangetriebene Betrachtungsweise des Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen dar.

c) Neben der am Genapparat angreifenden Deutungsweise steht die von Krüger (7) gemachte Beobachtung, daß isolierte Chromosomen aus der Speicheldrüse einer bestimmten Insektenart auf eine Er-

höhung der Kaliumkonzentration auf Kosten der Natriumkonzentration im umgebenden Medium mit den gleichen morphologischen Veränderungen reagieren, wie sie Chromosomen intakter Zellen unter dem Einfluß des Steroidhormons Ecdyson zeigen. Damit erscheint auch für die Steroidhormone ein Wirkungsmechanismus diskutabel, der eine hormonell ausgelöste Veränderung der Zellpermeabilität und einen hiermit ermöglichten vermehrten Eintritt von Substraten für die Proteinsynthese in den "Target"-Zellen einschließt.

d) Williams-Ashman und Talalay (8-10) zeigten an einem aus menschlicher Placenta gewonnenen Enzymsystem, daß Steroidhormone als Wasserstoffüberträger zwischen Pyridinnukleotiden dienen können und brachten diese Beobachtung in Zusammenhang mit der physiologischen Wirkung dieser Substanzen. Das Enzymsystem wurde als "Transhydrogenase" bezeichnet und scheint nach neueren Untersuchungen mit der in der Cytoplasma-Fraktion der Humanplacenta vorkommenden hochaktiven 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase identisch zu sein. Das Reaktionsschema, das von den Autoren formuliert wurde, ist folgendes:



Die an der "Transhydrogenase-Funktion" im Sinne von Williams-Ashman und Talalay beteiligte 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase ist ein in niederen und höherorganisierten Organismen ubiquitär vorkommendes Enzym, das reversibel die Reaktion Hydroxygruppe $\rightleftharpoons$ Oxogruppe im Steroidkörper von z. B. Sexualhormonen zur biologischen Aktivierung im Rahmen von Syntheseprozessen bzw. zur biologischen Inaktivierung bei der Bildung ausscheidungsfertiger Endprodukte des Steroidhormonstoffwechsels katalysiert. Pollow und Mitarbeiter (11-18) und Wenzel und Mitarbeiter (19-23) machten eine zweite Funktion der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in einer Reihe von Untersuchungen deutlich, die in der Katalyse eines spezifischen Wasserstofftransfers zwischen stoffwechselaktiven Positionen von Sexualhormonen (z. B. zwischen der 17-Position von Östradiol- 17β und der 17-Position von Androstendion oder der 17-Hydroxygruppe von Östradiol- 17β und der 20-Oxogruppe von Progesteron) besteht. Von diesen Autoren wurde die beschriebene Funktion mit dem molekularen Wirkungsmechanismus der Steroidhormone in Verbindung gebracht. Das folgende Schema soll den Wasser-

stofftransfer zwischen Steroidhormonen verdeutlichen:



Dieser spezifische Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen ist, wie die folgenden Untersuchungen zeigen werden, kein enzymkinetisches Phänomen einer substratspezifischen Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, sondern ist bedingt durch die räumlich enge Verflechtung zweier substrat- und positionsspezifisch katalysierenden Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen (17 β - und 20 α -Enzym) in einem definierten Zellkompartiment verbunden mit einer zielgerichteten Wanderung spezifisch reduzierter Pyridinnukleotide als obligate wasserstoffübertragende Coenzyme innerhalb dieses Zellkompartimentes.

Das kann bedeuten, daß Steroidhormone als wasserstoffübertragende Coenzyme an Wasserstoffüberträgerketten in distinkten Zellräumen bzw. zwischen morphologisch unterschiedlichen Zellkompartimenten (Mitochondrien - Cytoplasma oder Mikrosomen - Cytoplasma) beteiligt sind. Um das Phänomen 'Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen' in diesem Sinne interpretieren zu können, bedarf es aber einer genauen Kenntnis der intrazellulären Verteilung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen und einer eindeutigen Separierung der teilweise strukturgebundenen, teilweise löslichen Enzymsysteme.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, um diese Fragen für die 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase der Humanplacenta zu beantworten. Besonderes Augenmerk wurde auf die assoziative Verflechtung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen mit der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien gelegt.

2. Material und Methodik

2.1. Steroide

(4-¹⁴C)Östradiol-17 β (spez. Aktiv. 58 mCi/mMol), (4-¹⁴C)Östron (spez. Aktiv. 58 mCi/mMol), (4-¹⁴C)Progesteron (spez. Aktiv. 60 mCi/mMol), (4-¹⁴C)Testosteron (spez. Aktiv. 58,2 mCi/mMol), (4-¹⁴C)Androstendion (spez. Aktiv. 60 mCi/mMol) und (17 α -³H)Östradiol-17 β (spez. Aktiv. 3 Ci/mMol) waren Handelspräparate (Radiochemical Centre, Amersham, England). Δ^4 -Pregnen-3on,20 α -ol-³H wurde nach Purdy et al. (24) hergestellt. Die nicht radioaktiv markierten Steroide wurden von der Firma Schering AG, Berlin, zur Verfügung gestellt. Alle Steroide wurden dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft.

2.2. Substanzen

Ficoll, DEAE-Sephadex A 50: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden. BioGel A-0,5 M (200-400 mesh): Bio Rad Laboratories, Richmond, California. Ampholine pH 5-7, pH 3-10: LKB Producter AB, Stockholm, Schweden. Rinderserumalbumin: Behringwerke, Marburg/Lahn. Benzylamin, Tetrazoliumchlorid, Jodacetamid: Schuchardt, München. p-Chlormercuribenzoat: C. Roth, Karlsruhe. Lubrol WX: I.C.I. Organics, Inc., Frankfurt. Triton-X-100, Cyanogum 41, Lichtgrün SF, Riboflavin, Phenazin Methosulfat, β -Hydroxybuttersäure, Glycyl-Glycin: Serva, Heidelberg. DNS aus Kalbsthymus, RNS aus Hefe, NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, ADP, Hexokinase, α -Oxoglutarat, Succinat, Cytochrom c aus Rinderherz, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Test, Rinderserumalbumin, Aldolase, Katalase, Chymotrypsinogen, Ovalbumin: Biochemica Boehringer, Mannheim. Saccharose, CsCl, Digitonin, EDTA, Triäthanolamin, Fiske-Subbarow-Reagenz, p.a.-Lösungsmittel: E. Merck, Darmstadt.

Puffermedium A: 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin (pH 7,4), 3 mM Magnesiumacetat. Puffermedium B: 2,4 M Saccharose, 1 mM Magnesiumacetat. Puffermedium C: 0,05 M Kaliumphosphat, 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, 3 mM Magnesiumacetat (pH 7,4). Puffermedium D: 0,4 M Kaliumphosphat, 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, 3 mM Magnesiumacetat (pH 7,4).

2.3. Aufarbeitung des Placentagewebes

Die Humanplacenten wurden von der Städtischen Frauenklinik, Berlin-Charlottenburg, zur Verfügung gestellt. Das nach normal verlaufener Schwangerschaft ausgestoßene Material wurde auf Eis zum Laboratorium transportiert und nach Ablösen der fetalen Membranen, bindegewebigen Septen und der Gefäße mit der Schere zerkleinert. Nach Vorbehandlung für 30 sek mit der 10fachen Gewichtsmenge Puffermedium A im Ultra Turrax bei 220 V wurde der Gewebebrei im Glas-Homogenisator-Potter mit Teflonstempel bei 1000 U/min durch zehnmaligen Vor- und Rücklauf homogenisiert. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.3.1. Differentialzentrifugation

Das Homogenat wurde durch vier Gazestreifen filtriert und einer Fraktionierung nach folgendem Schema unterworfen:

Kerne: Die Kerne wurden durch niedertourige Zentrifugation (850 x g, Rotor SS 34, Servall RC-2, 15 min) abgetrennt, in Puffermedium A aufgenommen und über Puffermedium B bei 60 000 x g im SW 25, Ultrazentrifuge L2-65B, Firma Beckmann, für 60 min sedimentiert. Der Niederschlag wurde zweimal in Puffermedium B gewaschen und stellt die gereinigte Kernfraktion dar.

Mitochondrien: Aus dem kernfreien Homogenat wurde zunächst eine Fraktion schwerer Mitochondrien bei etwa 5500 x g abgetrennt, der Niederschlag einmal in Puffermedium A gewaschen und in Anlehnung an Brown (25) durch eine Ficoll-Gradienten-Zentrifugation in Mitochondrien, Peroxisomen und lysosomenreiche Fraktionen aufgetrennt (Ficoll-Gradienten 0-15 % (Gew./Vol.) in Puffermedium A, Saccharosepolster 2,4 M, 7000 U/min, Rotor SW 25). Die endgültige Reinigung der Rohfraktionen erfolgte über eine Saccharose-Dichte-Gradienten (20-60 % (Gew./Vol.)) bei 30 000 U/min, 4 Std. im Rotor SW 65. Entsprechend wurde nach Abtrennung der schweren Mitochondrien ein bei 12 000 x g gewonnenes Sediment mit einem hohen Anteil an Lysosomen, Peroxisomen und Mikrosomen aufgearbeitet.

Mikrosomen: Aus dem mitochondrienfreien Überstand (25 000 x g-Überstand) wurde durch Sedimentation bei 105 000 x g, 120 min im Rotor 30, Firma Beckmann, die Mikrosomenfraktion gewonnen. Der Überstand enthält alle nicht sedimentierten cytoplasmatischen Anteile. Die Mikrosomen wurden in glatte und raue Strukturen nach der Methode von Dallner, Siekevitz und Palade (26) getrennt. 2,5 ml einer 1,3 M Saccharoselösung, die 15 mM an Calciumchlorid war, wurden in 5,0-ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Über diese Lösung wurde die zu untersuchende Probe in 2,5 ml 0,25 M Saccharoselösung unter Zusatz von 15 mM Cäsiumchlorid überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW 65 Rotor für 210 min bei 130 000 x g. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Leitenzymbestimmungen, die der Kerne über den DNS/RNS-Quotienten sowie elektronenoptisch kontrolliert.

2.3.2. Zonalzentrifugation

Zur Untersuchung der intramitochondralen Verteilung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen wurde eine Mitochondrien-Rohfraktion durch Sedimentation des kernfreien Homogenats bei 12 000 x g im SS 34 Rotor gewonnen, zweimal gewaschen und in 30 ml Puffermedium A suspendiert (1 ml/10 g Gewebe). Die Suspension wurde fraktioniert in dem Zonal-Rotor Ti 14 der Firma Beckmann. Die für diese Fraktionierung verwendete Dichte-Gradienten wurde mit der Beckmann-Gradienten-Pumpe (Modell 141) gemischt und über die obere Füllereinheit (Fa. Beckmann) in den mit 3000 U/min laufenden Rotor gepumpt. Die Einfüllzeit war 15 Minuten. Der Gradient enthielt in 8,5 % (Gew./Gew.) Saccharose 0-11,5 % (Gew./Gew.) Ficoll. An diesen Gradienten schloß sich nach außen ein Polster aus 55%iger Saccharoselösung (50 ml) an, das die Sedimentation schwerer Partikel auf den Rotorboden verhindern sollte. Nach innen schloß sich an den Gradienten die Probe an (20 ml), gefolgt von 30 ml Overlay aus 1%iger Saccharoselösung (Gew./Vol.). Die Zentrifugation erfolgte für 15 min bei 12 000 U/min einschließlich der Zeit bis zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit sowie der Abpumpgeschwindigkeit von 3000 U/min (27). Nach der Zentrifugation wurde der Rotor von innen nach außen mit Wasser ausgepumpt (Core B 29) und das gesamte Rotorvolumen in 5-ml-Fractionen mit Hilfe eines LKB Ultro Rac Fraktionensammlers gesammelt. Die op-

tische Dichte wurde bei 254 nm mit dem Uvicord I gemessen. Der Dichtegradient wurde über den Brechungsindex der einzelnen Fraktionen mit dem Abbe-Refraktometer (Fa. Zeiss) überprüft.

2.3.3. Mitochondrien-Subfraktionierung

Die Mitochondrien-Kompartimente wurden auf zwei verschiedenen Wegen gewonnen. Einmal wurden die Mitochondrien nach dem von Schnaitman et al. (28) entwickelten Verfahren der Digitoninbehandlung in Fraktionen zu 100 mg Protein/ml in 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM β -Hydroxybuttersäure, 20 mM Triäthanolamin, pH 7,4 und 500 mg Rinderserumalbumin/ml suspendiert und mit 1,5 mg Digitonin/10 mg mitochondrialen Proteins unter vorsichtigem Rühren versetzt. Nach 15 min wurde die Suspension 1:3 verdünnt, homogenisiert und bei 12 000 x g für 10 min zentrifugiert. Die weiteren Operationen entsprachen der Vorschrift von Chan et al. (29). Die membranösen Fraktionen wurden nach Whereat et al. (30) weitergereinigt.

Die zweite Methode beruht auf der Trennung von innerer und äußerer Membran durch Inkubation der Mitochondrien in hypotonem Phosphatpuffer nach Parsons et al. (31). Über Ficoll gereinigte Mitochondrien wurden wie in (31) beschrieben 20 min einem 20 mM Phosphatpuffer mit 0,02 % Rinderserumalbumin ausgesetzt. Dann wurde bei 1900 x g (Servall-Zentrifuge, Rotor SS 34, 4000 U/min) zentrifugiert. Der Niederschlag enthält die "inner membrane ghosts", die weitgehend mit Mitoblasten (= "inner membrane matrix"-Fraktion nach Chan et al. (29)) identisch sind. Im Überstand befinden sich verunreinigte äußere Mitochondrienmembranen, sowie Enzyme des Intermembranraumes. Die "inner membrane ghosts" wurden wie die "inner membrane matrix"-Fraktion nach Chan et al. (29) 30 min bei 0 °C mit 0,1 ml Lubrol WX/mg Protein behandelt und anschließend durch Zentrifugation (1 Std., 105 000 x g) in eine membranöse und eine lösliche Fraktion aufgetrennt, die der "inneren Membran" bzw. der "Matrix" entsprechen. Die innere Membran wurde nach Whereat et al. (30) weitergereinigt. Der 1900 x g-Überstand entsprach der Fraktion "Intermembranraum". Der Niederschlag wurde einer weiteren Reinigung nach Whereat et al. (30) unterworfen und ergab die Fraktion "Äußere Membran".

2.4. Reinigung und Anreicherung der intramitochondralen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

Die nach Schnaitman (28) bzw. Whereat et al. (30) hergestellten Außenmembran-Fraktionen von Humanplacenta-Mitochondrien wurden unter Zusatz von Triton-X-100 (5 mg/10 mg Protein) 12 Stunden bei 4°C gerührt, anschließend die Suspension bei 105 000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Separierung der abgelösten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen den folgenden Einzelschritten unterworfen.

2.4.1. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Durch Zugabe von feingepulvertem Ammoniumsulfat (pH 7,0) zum 105 000 x g-Überstand wurden die durch Triton-X-100-Behandlung in den Überstand abgelösten mitochondrialen Proteine fraktioniert gefällt. Die Fällungsrückstände (20 000 x g-Sedimentation) wurden gegen Puffermedium A dialysiert und anschließend auf Enzymaktivität geprüft.

2.4.2. Agarose-Gelchromatographie an BioGel A-0,5 m

Die dialysierten enzymaktiven Ammoniumsulfatfällungsrückstände (30-60% Sättigung) wurden gefriergetrocknet und anschließend in 2 ml Puffermedium A gelöst und auf eine BioGel A-0,5 m-Säule (Länge 100 cm, Durchmesser 1,5 cm), die mit Puffermedium A äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit dem äquilibrierenden Puffermedium A. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 20 ml/Std. Die Eluate wurden in Fraktionen von etwa 0,5 ml in einem LKB Fraktionensammler aufgefangen, der Eiweißgehalt mittels einer Durchflußküvette durch kontinuierliche Messung der UV-Absorption bei 254 nm (LKB Uvicord I) bestimmt.

2.4.3. DEAE-Ionenaustauschchromatographie

DEAE-Sephadex wurde 12 Stunden in destilliertem Wasser zum Quellen aufbewahrt. Nach mehrmaligem Absaugen der schwer sedimentierenden Anteile wurde der Anionenaustauscher zunächst mit 0,3 N NaOH und dann mit 0,3 N HCl gewaschen. Anschließend wurde mit

destilliertem Wasser neutralgespült. Der so vorbereitete Ionenaustauscher wurde in Puffermedium C aufgenommen und nach sorgfältiger Entlüftung auf eine Säule gegeben (1,5 cm x 45 cm). Die über Nacht mit dem Puffermedium C äquilibrierte Säule wurde am nächsten Morgen mit einem Volumen von 2 ml der enzymaktiven Eluate der BioGel A 0,5 m-Säule durch Unterschichtung des überstehenden Puffers beschickt. Die Elution der Proteine aus dem Ionenaustauscher erfolgte mit einer linearen Puffergradienten, die durch das Mischen zweier konstanter Volumina (150 ml) von Puffermedium C und Puffermedium D hergestellt wurde. Die Durchflugeschwindigkeit betrug 10 ml pro Stunde. Die Eluate wurden in Fraktionen von etwa 0,5 ml in einem LKB Fraktionensammler aufgefangen. Der Eiweißgehalt wurde kontinuierlich mittels einer Durchflußküvette durch Messung der UV-Absorption bei 254 nm (LKB Uvicord I) ermittelt.

2.4.4. Isoelektrofokussierung in einer 110-ml-Säule

Die nach DEAE-Sephadex-Chromatographie erhaltenen enzymaktiven Fraktionen wurden gegen Puffermedium A dialysiert, gefriergetrocknet, in 2 ml Puffermedium A gelöst und nach der Vorschrift von Vesterberg und Svensson (32) in einer 110-ml-Säule (Fa. LKB Producter AB, Stockholm, Schweden) bei 4°C in einer automatisch hergestellten Saccharose-Dichte-Gradienten isoelektrofokussiert. Zur Ausbildung der pH-Gradienten wurden Trägerampholyte (Standardampholin 40%, Firma LKB Producter AB, Stockholm, Schweden) für den pH-Bereich 5-7 verwendet. Als Anodenpuffer diente Orthophosphorsäure, als Kathodenpuffer Äthylendiamin. Die Fokussierung war nach etwa 50 Stunden beendet.

2.4.5. Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-Gelen

Acrylamid-Dünnschicht-Gelmembranen (17 cm x 3 cm) wurden hergestellt durch Fotopolymerisation - induziert durch Riboflavin - einer 5%igen Acrylamidlösung (Gew./Vol.) (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg) zwischen zwei Glasplatten in einem Abstand von 1 mm. Dem Acrylamid-Gel wurde in einer Konzentration von 1% (Gew./Vol.) Trägerampholyte zugesetzt (Ampholin LKB Producter AB, Stockholm, Schweden) (13,33-38). Das Gesamtvolumen pro Gelplatte

te betrug 6 ml einschließlich 0,2 ml Proteinlösung. Nach Abschluß der Fotopolymerisation, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, wurde eine der Glasplatten vorsichtig vom Gel abgehoben, so daß die Dünnschicht-Gel-Membran auf der anderen Glasplatte haften blieb. Zur elektrophoretischen Entwicklung wurden die Gel-Membranen in einem wasserdampfgesättigten Elektrophoresekasten auf Kohleelektroden gelegt, wobei auf der Kathode sich mit 5 % Triäthanolamin getränktes Fließpapier befand, auf der Anode solches mit 5 % Perchlorsäure. Der Elektrodenabstand betrug 14,5 cm. Die Spannung wurde im Verlauf der ersten 4 Stunden von 100 V auf 300 V gesteigert. Nach etwa 12 Stunden stellte sich eine konstante Stromstärke von 0,5 mA ein. Die Fokussierung wurde nach etwa 16 Stunden beendet. Die Elektrodenlage wurde auf der Glasplatte markiert. Zur Überprüfung der pH-Gradienten wurde die Gel-Membran zwischen den Elektrodenmarkierungen in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und der pH-Wert gemessen. Die Eiweißfärbung wurde eine Stunde lang durchgeführt mit 0,1%iger Lichtgrünlösung (0,5 N Essigsäure/Methanol 100:30 Vol./Vol.). Gewaschen wurde bis zur Entfärbung des Untergrundes mit 0,5 N Essigsäure/Methanol 100:30 (Vol./Vol.) und anschließend konserviert mit Waschlösung, der 1 % Glycerin zugesetzt war. Die lichtgrün gefärbten Eiweißbanden wurden im Eppendorf-Fotometer mit Linearschreiber bei 578 nm densitometrisch ausgewertet.

Die 17 β - bzw. 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivitäten wurden in vitro auf der Gel-Membran nach einer modifizierten Methode nach Davies (39) bestimmt, die auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes zu Formazan beruht, das sich als wasser- und fett-unlöslicher, tiefdunkler Niederschlag am Ort der Enzymaktivität direkt nachweisen läßt. Dazu wurde die Gel-Membran für 2 Std. bei 37 °C in einer Lösung, bestehend aus 30 ml Tris/HCl-Puffer (pH 9,2), 10 mg Steroid, gelöst in 0,2 ml Propylenglycol, 20 mg NAD⁺, 16 mg p-Nitroblautetrazoliumchlorid und 0,2 mg N-Methylphenaziniumsulfat inkubiert. Die Gel-Membran wurde nach spezifischer Anfärbung densitometrisch ausgewertet.

2.5. Enzymaktivitätsbestimmungen:

Die in Äthanol gelösten Steroide wurden zur Trockene eingeeengt und in 0,1 ml Propylenglycol pro Ansatz (Endkonzentration 2,4 %) aufgenommen. Den Reaktionsansätzen wurde jeweils 1 mg wasserstoffübertragendes Coenzym (NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH) zugesetzt. Die Inkubationen erfolgten in einem Warburg-Schüttelthermostaten unter Luftzutritt. Das Reaktionsmedium war im Regelfall Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4. Das Endvolumen betrug 4,1 ml. Die für den speziellen Einzelfall geschaffenen Inkubationsbedingungen sind den Legenden der Abbildungen und Tabellen zu entnehmen.

2.5.1. 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität

Die 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität wurde durch Messen der Reaktionsschritte Östradiol-17 β $\longrightarrow$ Östron (Oxidation) bzw. Östron $\longrightarrow$ Östradiol-17 β (Reduktion) bestimmt. Die Inkubationsansätze enthielten jeweils 0,1 μCi ($4\text{-}^{14}\text{C}$) Östradiol-17 β bzw. Östron unter Zusatz von 10 μMol nicht radioaktiv markiertem Steroid. Puffermedium war Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 (Oxidation), pH 6,0 (Reduktion).

2.5.2. 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität

Die Aktivität der 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase wurde durch Messen des Reaktionsschrittes Progesteron $\longrightarrow$ Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol bzw. Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol $\longrightarrow$ Progesteron bestimmt. Die Radioaktivitätsmengen und Konzentrationsverhältnisse waren denen der Östrogene äquivalent. Puffermedium war Ringer-Phosphat-Puffer, pH 8,0 (Oxidation), pH 6,0 (Reduktion). 0,5 mg Albumin wurde den Inkubationsansätzen als Aktivator zugesetzt (40,41).

2.5.3. Messung der "Transhydrogenase-Aktivität"

Zur Bestimmung des Wasserstoff(^3H)-Transfers enthielten die Inkubationsansätze ($17\alpha\text{-}^3\text{H}$) Östradiol-17 β als Wasserstoff-Donator und inaktives Progesteron als Wasserstoff-Akzeptor. Gemessen wurde die im Progesteron-Reduktionsmetaboliten (Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol) gebundene ^3H -Aktivität ausgedrückt in μMol Östradiol-17 β -

Wasserstoff. Die Substratkonzentrationen sind in den entsprechenden Tabellen und Abbildungen angegeben.

2.6. Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Die Inkubationen wurden durch Einbringen der Reaktionsgefäße in Eiswasser beendet. Durch dreimaliges Ausschütteln der Inkubationsmedien mit jeweils 5 ml Äther/Chloroform 3:1 wurden die Steroidmetaboliten extrahiert, über Stickstoff zur Trockene eingengt und in 0,1 ml Äthanol aufgenommen. Die in Äthanol aufgenommenen Extraktionsrückstände wurden auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Als Trägermaterial wurde Kieselgel F₂₅₄ (Schichtdicke 0,25 mm) und Polyamid 11 F₂₅₄ (Schichtdicke 0,15 mm) der Firma Merck, Darmstadt, verwendet in Form von Glas-Fertigplatten bzw. Alufolien (20 cm x 20 cm). Die Chromatographie erfolgte aufsteigend in geschlossenen Systemen mit den Laufmitteln Cyclohexan/Essigester 1:1, Benzol/Methanol 19:1 und Chloroform/Aceton 17:3. Die Laufzeit betrug auf Kieselgel 45 min und auf Polyamid 2 Std. Die quantitative Bestimmung der einzelnen radioaktiv markierten Steroide erfolgte durch direkte Messung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte mit Hilfe des Dünnschichtscanners II der Firma Berthold, Wildbad, unter Verwendung eines fensterlosen Methan-Durchflußzählers mit 2 π -Zählgeometrie und gleichzeitiger Integration der einzelnen Substanzgipfel mit dem Berthold-Integrationsschreiber. Die Zählausbeute wurde durch Mitlaufen eines radioaktiven Standards für jede Platte einzeln bestimmt. Die Identifizierung der radioaktiven Substanzgipfel erfolgte durch Mitlaufen authentischer Referenzsubstanzen, die durch auffallendes UV-Licht bzw. durch Anfärben mit 70%iger äthanolischer Schwefelsäure sichtbar gemacht wurden, und durch mikrochemische Methoden (a)Oxidation mit Chromtrioxid/Eisessig, b) Reduktion mit Natriumhydrid, c) Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Benzol, d) Umkristallisieren der radioaktiven Metabolite mit authentischer Substanz aus drei verschiedenen Lösungsmitteln (Äthanol, Benzol, Cyclohexan/Essigester 1:1) bis zur konstanten spezifischen Aktivität).

2.7. Bestimmung der Leitenzyme

Die Bestimmung der Leitenzyme erfolgte nach bewährten Routinemethoden: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nach Bücher et al. (42), NADPH-Cytochrom-c-Reduktase nach Omura und Takesue (43), Succinat-Dehydrogenase nach Arrigoni und Singer (44), Urat-Oxidase nach Mahler et al. bei 25 °C (45), Saure Phosphatase nach Leighton et al. (46), Monoamin-Oxidase nach Schnaitman et al. (47), Adenylat-Kinase nach Schnaitman et al. (47) und Glutamat-Dehydrogenase nach Bergmeyer (48).

2.8. Bestimmung von DNS und RNS

DNS wurde nach Burton (49) bestimmt. Die Eichung erfolgte mit DNS aus Kalbsthymus (Biochemica Boehringer, Mannheim). RNS wurde nach Ceriotti (50) bestimmt.

2.9. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (51). In Gegenwart von Detergentien wurden Störungen beobachtet. In diesen Fällen wurde die Biuret-Methode nach Beisenherz et al. (52) verwendet. Als Eichprotein diente Rinderserumalbumin.

2.10. Elektronenmikroskopie

Das Material wurde mit Glutaraldehyd nach der Methode von Karnovsky (53) fixiert. Die Kontrastierung erfolgte in gepufferter Osmiumtetroxidlösung. Anschließend wurde das Material in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) entwässert und in E.R.L. 4206 (aliphatisches Epoxid) nach der Methode von Spurr (54) eingebettet. Mit einem LKB-Mikrotom wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylcitrat in Bleicitratlösung nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden in einem Elektronenmikroskop, Siemens Elmiskop 1 A, ausgeführt.

2.11. Phospholipoidbestimmung

2.11.1. Gesamtpospholipoid

Die durch Zonalzentrifugation gereinigten Mitochondrien wurden nach Folch et al. (55) mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert und die Extrakte mit CaCl_2 -Lösung gewaschen. Zur Bestimmung des Phosphorgehaltes wurde die Methode von Bartlett (56), modifiziert nach Pollow et al. (18), angewendet.

2.11.2. Bestimmung der Einzelphosphatide

Die Phosphatid-Gesamtfraktion wurde auf mit "Kieselgel 60HR reinst nach Stahl" (Fa. Merck) beschichteten Dünnschichtplatten aufgetragen und im geschlossenen System in Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 25:15:4:2 (Vol./Vol.) etwa 45 Minuten lang chromatographiert. Die Phosphatidflecken wurden mit Joddampf sichtbar gemacht, abgeschabt und in phosphorfreie Bestimmungsgläser überführt. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach Pollow et al. (18).

2.12. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der aus der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen wurden durch Gel-filtration an BioGel A-0,5 M vorgenommen. Die Chromatographiesäule hatte eine Länge von 150 cm und einen Durchmesser von 2 cm. Sie wurde mit Testproteinen geeicht. Die Elutionsvolumina der Enzymaktivitäten und der Eichproteine zeigten gut reproduzierbare Werte.

3. Ergebnisse

3.1. Zellfraktionierungsstudien

Entsprechend der Fragestellung wurden durch Zellfraktionierungsverfahren die Kern-, Mitochondrien-, Lysosomen-, Peroxisomen-, Mikrosomen- und Cytoplasma-Fractionen der Humanplacenta gewonnen, die Mikrosomen in rauhe und glatte Strukturen separiert, die rohe Mitochondrien-Fraktion in definierte Subfraktionen aufgetrennt und eine eindeutige Zuordnung der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase zu den subzellulären Fractionen, deren Reinheitsgrad durch Leitenzymbestimmungen und durch Elektronenmikroskopie kontrolliert wurde, vorgenommen. In der Tabelle 1 sind repräsentativ für die weiteren Untersuchungen mit qualitativ identischen und quantitativ vergleichbaren Ergebnissen die Befunde einer Fraktionierungsstudie zusammengefaßt.

Zellfraktionen	Glucose 6-P-Deh.	Succinat-Deh.	Saure Phosphatase	Urat- Oxidase	NADPH Cytochrom-c- Reduktion	20 α - 17 β -
	(A $\cdot$ mol min $\cdot$ mg)					
Homogenat	8,3	3,7	16,9	3,8	13,2	11,3 103,9
Kerne	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	n.n. n.n.
Mitochondrien	n.n.	13,8	128,0	9,1	15,3	80,3 76,3
Lysosomen	n.n.	1,8	218,0	3,6	18,7	3,8 12
Peroxisomen	n.n.	2,2	103,6	48,7	12,8	5,7 8
Mikrosomen	n.n.	1,2	36,7	n.n.	76,8	38,4 217,0
Cytoplasma	-	-	-	-	-	21 8

Tab.1 Spezifische Aktivitäten von Leitenzymen und der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in den präparierten Zellfraktionen.
Einzelheiten siehe Abschnitt
n.n. = nicht nachgewiesen

Eine geringgradige Verunreinigung der Kernfraktion, die durch einen RNS/DNS-Quotienten von 0,26 charakterisiert war, erfolgte durch mikrosomale Anteile. Die funktionell intakte Mitochondrien-Fraktion zeigte lysosomale, peroxisomale und mikrosomale Verun-

reinigungen, stellte also eine Mischfraktion dar, wobei aber die spezifischen Aktivitäten der extramitochondralen Fremdenzyme als befriedigend niedrig betrachtet werden konnten. Mitochondrale Verunreinigungen der Lysosomen-Fraktion waren zu vernachlässigen, dagegen war eine lysosomale und mikrosomale Verunreinigung der Peroxisomen nicht zu verhindern. Die Mikrosomen waren außer einem geringen Gehalt an saurer Phosphatase ohne nennenswerte Fremdkativitäten darstellbar.

Die in Tabelle 1 erfaßten Zellfraktionen, hergestellt mit Differentialzentrifugationsmaßnahmen, die mit der Routineausrüstung jedes biochemischen Labors durchführbar sind, imponieren nicht durch den hohen Reinheitsgrad, wie er von de Duve und Mitarbeitern (46) erzielt wurde, gestatten aber eine eindeutige Zuordnung von Enzymen zu den einzelnen Zellorganellen. Die Zuordnung des 17 β -Enzyms zu den einzelnen Zellräumen der Humanplacenta erfolgt, wie die Tabelle 1 erkennen läßt, auf die Cytoplasma-Fraktion und "strukturegebunden" auf Mikrosomen und Mitochondrien, wobei die höchste spezifische Aktivität das lösliche Enzym zeigt. Die subzelluläre Verteilung für das 20 α -Enzym ist die gleiche, dagegen findet sich die höchste spezifische Aktivität in der Mitochondrien-Fraktion.

3.1.1. Subfraktionierung der Mitochondrien-Rohfraktion

Die Subfraktionierung der Mitochondrien-Rohfraktion erfolgte nach den Vorschriften von Chan et al. (29) und Parsons et al. (31). Dabei fanden sich bei beiden Fraktionierungsmethoden qualitativ identische Ergebnisse in bezug auf die vier Fraktionen "äußere Membran", "Intermembranenraum", "innere Membran" und "Matrix", die sich am Mitochondrienmodell nach Ernster und Kuylentierna (73) orientieren. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung nach Subfraktionierung sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß unabhängig von der Präpariermethode die Verteilung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen dem Verteilungsmuster der Monoamin-Oxidase, dem Leitenzym der "äußeren Membran", entspricht.

submitochondriale Fraktionen	Succinat-Dehydrogenase	Nonaamin-Oxidase	Adenylat-Kinase	Glutamat-Dehydrogenase	2°-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
(Schnaitman)					
Mitochondrien	14,1	3,2	16,7	21,8	80,8 74,1
innere Membran	33,7	1,8	n.n.	3,1	18,7 1
äußere Membran	4,8	48,7	3,7	n.n.	211,7 187,1
Intermembranraum	n.n.	n.n.	121,8	3,8	n.n. n.n.
Matrix	n.n.	n.n.	n.n.	38,7	n.n. n.n.
(Parsons)					
Mitochondrien	16,1	1,8	22,8	33,2	91,7 80,3
innere Membran	44,8	1,4	n.n.	3,1	21,2 13,8
äußere Membran	4,4	62,3	4,3	n.n.	257,8 203,7
Intermembranraum	n.n.	n.n.	141,7	2,7	n.n. n.n.
Matrix	n.n.	n.n.	n.n.	53,7	n.n. n.n.

Tab. 2 Spezifische Aktivitäten und Ausbeuten von Leitenzymen und der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in verschiedenen, nach den Methoden von Schnaitman und Parsons gewonnenen, submitochondrialen Fraktionen
Einzelheiten siehe Abschnitt 2
n.n. = nicht nachgewiesen

Fraktionen	zweimal gewaschene Mikrosomen-Fraktion			
	20g. X 1	20g. X 1	20g. X 1	20g. X 1
	$\rho^{\pm}$			
Ausgangswert	61,3			242,8
1,2% M Saccharose (Zone 1)	3,2			12,7
glatte Strukturen (Zone 2)	51,8			214,5
1,3% M Saccharose (Zone 3)	7,5			24,3
rauh Struktur (Zone 4)	68,7			208,8

Tab. 3 Cesiumchlorid-Sechsalz-Dichtegradienten-Zentrifugation der Mikrosomen-Fraktion des Rattenschwanzes
Einzelheiten siehe Abschnitt

3.1.2. Subfraktionierung der zweimal gewaschenen Mikrosomen-Fraktion

Die Subfraktionierung der zweimal gewaschenen Mikrosomen-Fraktion erfolgte in rauhe und glatte Strukturen. Die Resultate in der Tabelle 3 zeigen, daß die spezifischen Aktivitäten der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in den rauhen und glatten Strukturen weitgehend denen der zweimal gewaschenen Mikrosomen-Fraktion analog sind, was darauf hindeutet, daß die Enzymaktivitäten mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziiert sind. Elektronenoptische Kontrollen der Zone 2 ergab glatte vesikuläre Strukturen, die Zone 4 bestand aus Ribosomen, Polysomen und einzelnen Vesikeln, die an die Ribosomen angelagert waren.

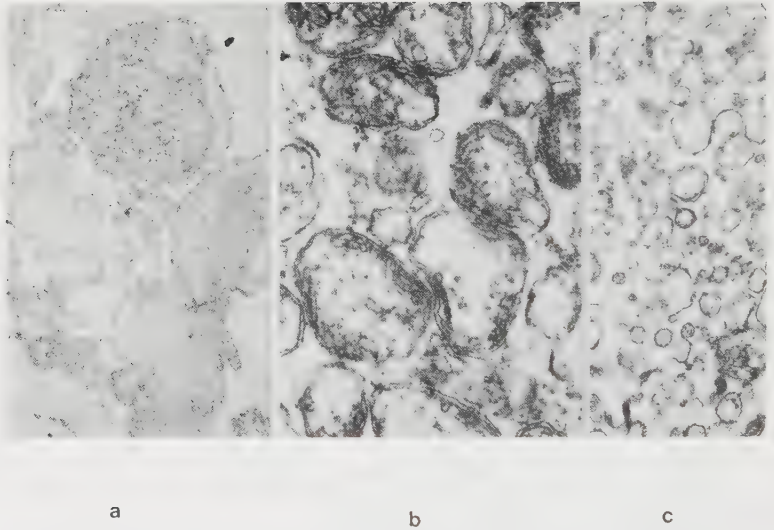
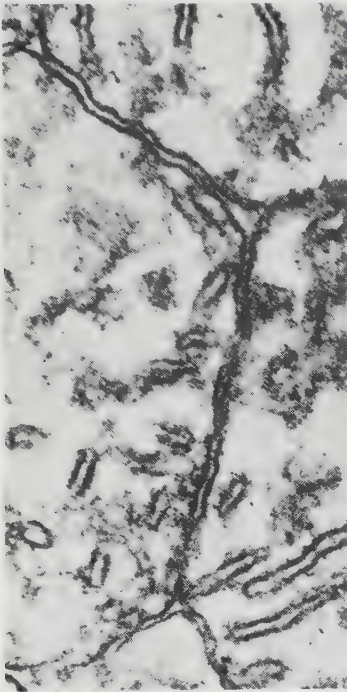


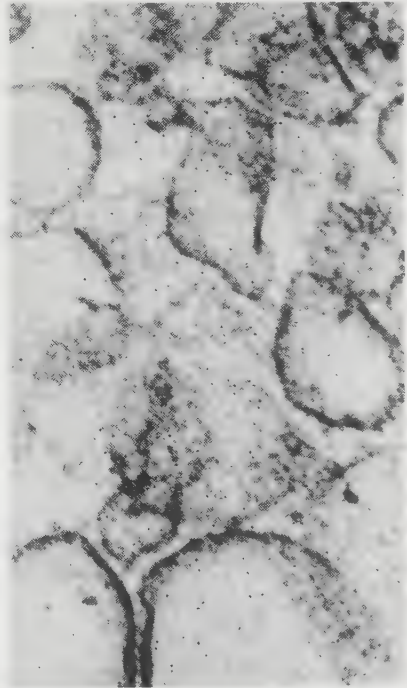
Abb.1 a) Gereinigte Kernfraktion, Vergrößerung 6000fach
 b) Im Zonallauf über eine lineare Ficoll-Dichtegradiente gereinigte Mitochondrien (Pfeil in Abb.3), Vergrößerung 30 000fach
 c) Zweimal mit 0,25 M Saccharoselösung gewaschene Mikrosomen, Vergrößerung 30 000fach

3.1.3. Elektronenoptische Kontrollen

Abbildung 1 zeigt typische elektronenoptische Aufnahmen der Kernfraktion, der über Zonallauf in einer linearen Ficoll-Gradierte gereinigten Mitochondrien-Fraktion und des zweimal gewaschenen 105 000 x g-Sediments. In der Abbildung 2 sind die elektronenoptischen Kontrollen der "äußeren" und "inneren" Membranen der subfraktionierten Humanplacenta-Mitochondrien erfaßt.



a



b

Abb. 2 Elektronenmikroskopie von Subfraktionen isolierter Humanplacenta-Mitochondrien
 a) äußere Membran, Vergrößerung 116 000fach
 b) innere Membran, Vergrößerung 76 000fach
 Einzelheiten der Subfraktionierung siehe Abschnitt 2.

Die "Außenmembranen" haben Vesikelgestalt, sind von einer Einfach-Membran umgeben und teilweise mit amorphem Material ausgefüllt. Die "Innenmembran" ist eine Einfach-Membran; der Innenraum zeigt deutlich Cristae-Strukturen. Die Befunde sind in ähnlicher Form von Whereat et al. (30) für Mitochondrienpräparationen von Kaninchenherz erhoben worden.

3.1.4. Zonalzentrifugation vorgereinigter Humanplacenta-Mitochondrien

Einen guten Einblick in die Schwierigkeiten der Reindarstellung von Zellorganellen gibt eine Untersuchung des 12 000 x g-Sediments in der Zonalzentrifugation. In der Abbildung 3 ist das Proteinelutionsbild und die Enzymaktivitätsverteilung eines Zonallaufes einer Mitochondrien-Rohfraktion von Humanplacenta in einer linear ansteigenden Dichtegradienten aus Ficoll - wie in Abschnitt 2 ausführlich beschrieben - dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt drei Proteingipfel, wobei Gipfel a der

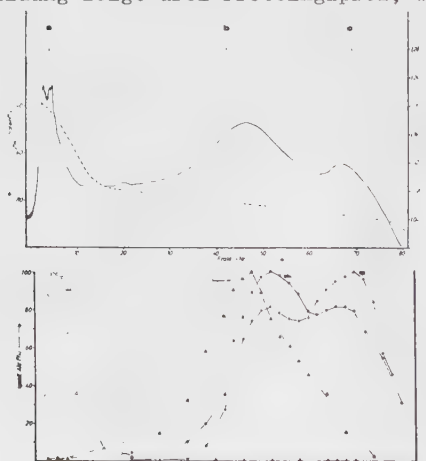


Abb.3 Zonalzentrifugation eines "kernfreien" 12 000 x g-Sediments (Mitochondrien-Rohfraktion) in einem linearen Ficoll-Dichtegradienten

oben: Ordinate: Proteingehalt in % der Transmission bei 254 nm
Dichte des Mediums bei 0°C (gestrichelte Linie)

unten: Ordinate: alle Angaben in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat

20α=20α-Enzym 17β=17β-Enzym

Succinat-DH = Succinat-Dehydrogenase

a: Kerne b: Mitochondrien c: Mikrosomen-Verunreinigungen

Einzelheiten zur Aufarbeitung siehe Abschnitt 2.

Zone des Rotorbodens entspricht. Elektronenoptische Untersuchungen der drei Gipfel ergaben, daß bei Gipfel a Kernverunreinigungen zu finden sind, bei Gipfel b die Mitochondrien sich darstellen und Gipfel c durch starke mikrosomale Verunreinigungen charakterisiert ist. Die Verteilung der Succinat-Dehydrogenase als Marker-Enzym für die Mitochondrien entspricht dem Proteingipfel b in der Elutionskurve. Die Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen verteilen sich mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität, sowohl in der Mitochondrien-Fraktion als auch in der mikrosomalen Verunreinigung (Gipfel c). Der DNS-Gipfel im unteren Teil der Abb. 3 dokumentiert in anschaulicher Weise die elektronenmikroskopisch gesicherte Kernverunreinigung des 12 000 x g-Sediments.

3.2. Ergebnisse der Isolierung, Anreicherung und Ausbeute der mitochondrialen 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

In Tabelle 4 sind Isolierungsgang und Ausbeute der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase aus Mitochondrien der Humanplacenta zusammengefaßt. Die Zunahme der spezifischen Aktivität von 86,8 μ Mol/min $\cdot$ mg auf 2506 μ Mol/min $\cdot$ mg für das 20 α -Enzym bzw. von 74,3 μ Mol/min $\cdot$ mg auf 1857 μ Mol/min $\cdot$ mg für das 17 β -Enzym ergibt eine maximale Anreicherung über die Elektrofokussierung

	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivität 20 α -17 β - (nMol/min)	Spez. Aktivität 20 α - (nMol/min $\cdot$ mg)	Total 17 β -20 α - (nMol/min)	Wiederfindg. (%)	Anreicherung 17 β -20 α - (n-fach)
Mitochondrien	320	8,7	755 646	86,8	74,3 241,6 206,7	100	-
Äußere Mitochondrienmembran nach Triton-X-100- Behandlung:	98	2,9	603 544	211,3	167,4 59,1 53,3 25,0	25,7 2,4	2,5
1. Überstand	87	1,0	238 201	238,0	201,0 20,7 17,5	8,6	8,4 2,7
2. Rückstand	20	1,9	554 405	291,6	213,0 11,1 8,1	4,6	3,9 3,4
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Sättigung (40-50%)	13	2,7	1430 1077	530,0	398,0 18,6 14,0	7,8	6,6 6,1
Riofocel A-O. 5 m (aktivierte Fraktion)	18	1,3	780 621	600,0	478,0 14,0 11,2	5,8	5,4 6,9
DEAE-Sephadex (aktivierte Fraktion)	10	0,8	1120 750	1400,0	938,0 11,2 7,5	4,6	3,6 16,1
Isoelektrofokussierung (aktivierte Frakt.konz.)	1,1	2,8	7018 5120	2506,0	1857,0 1,7 5,6	1,2	1,8 28,9

Tab. 4: Anreicherung der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen aus nach Parsons hergestellten Außenmembranen von Humanplacenta-Mitochondrien, die durch Zonal-Zentrifugation über einen linearen Ficoll-Gradienten gewonnen wurden. Einzelheiten vergleiche "Material und Methodik".

gegenüber der Mitochondrien-Rohfraktion auf das 29- bzw. 25fache. Für beide Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen liegt die Wiederfindung der Enzymaktivitäten zwischen 2% und 3%.

3.2.1. Ammoniumsulfatfällung

Abbildung 4 zeigt die Aktivitätsverteilung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in den Einzelschritten der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung. Jeweils zwischen 30% und 60% Ammoniumsulfatsättigung sind die höchsten Enzymaktivitäten fällbar.

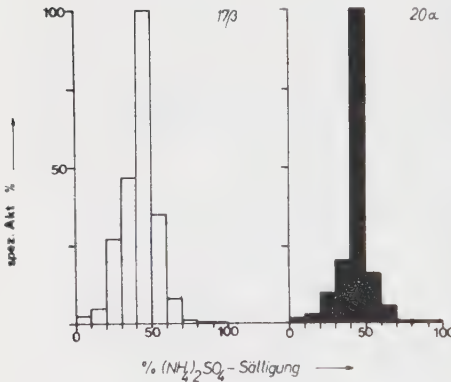


Abb. 4 Aktivitätsverteilung des 17 β - und 20 α -Enzyms nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung der mit Triton-X-100 behandelten, gereinigten Außenmembran-Fraktion von Humanplacenta-Mitochondrien
Ordinate: alle Angaben in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat.

17 β = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

20 α = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Einzelheiten siehe Abschnitt 2

3.2.2. Agarose-Gelfiltration

Die durch Ammoniumsulfatfällung angereicherten Enzymaktivitäten

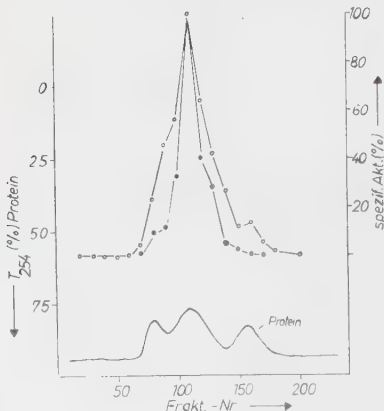


Abb. 5 Gelfiltration an BioGel A-0,5 m der dialysierten und eingengten Enzympräparationen nach Ammoniumsulfatfällung (30-60% Sättigung)
Ordinaten: Angaben in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat, Proteingehalt in % der Transmission bei 254 nm

○ = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

● = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Säulenlänge 100 cm, Durchmesser 1,5 cm, Elutionsvolumen 0,5 ml

Einzelheiten siehe Abschnitt 2

wurden einer Gelfiltration an BioGel A-0,5 m unterzogen. Die Proteinelutionskurve nach erfolgter Säulenchromatographie sowie die gemessene Enzymaktivitätsverteilung sind in der Abbildung 5 dargestellt. Mit dem Molekularsiebverfahren war eine Separierung des 17 β - und 20 α -Enzyms nicht zu erreichen.

3.2.3. DEAE-Sephadex-Säulenchromatographie

Abbildung 6 zeigt die typischen Ergebnisse nach Säulenchromatographie über DEAE-Sephadex nach Elution mit einer linearen Phosphatpuffer-Gradienten. Die Hauptaktivität des 17 β -Enzyms eluierte bei 0,113 M Phosphat, das 20 α -Enzym bei 0,125 M Phosphat. Da beide Enzymaktivitäten jeweils mit breiter Basis überlappend eluierten, war für den nachfolgenden Elektrofokussierschritt als letzte Anreicherungsmaßnahme nur ein Mischenzym aus beiden Enzymaktivitäten verwendbar.

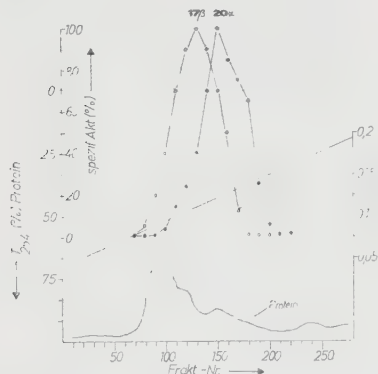


Abb.6 Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex der enzymaktiven Fraktionen nach Gelfiltration
 Ordinaten: Proteingehalt in % der Transmission bei 254 nm, Aktivitätsangaben in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat, Konzentration in Mol/l der linearen Phosphatpuffer-Gradienten in den einzelnen Fraktionen
 Säulenlänge 45 cm, Durchmesser 1,5 cm, Elutionsvolumen 0,5 ml
 17 β = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase
 20 α = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

3.2.4. Säulenelektrofokussierung

In Abbildung 7 sind die Verhältnisse der Enzymverteilung nach Isoelektrofokussierung der über DEAE-Sephadex angereicherten Enzymaktivitäten (Fraktionen zwischen 0,11 M und 0,13 M Phosphat) in einer gespreizten pH-Gradienten von pH 5-7 dargestellt. Beide Enzymaktivitäten sind eindeutig separierbar durch Ausfällung bei unterschiedlichen pH-Werten. Das 20 α -Enzym präzipitiert bei etwa

pH 6,0, das 17 β -Enzym hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 6,6.

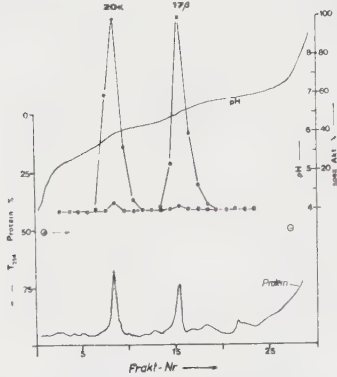


Abb. 7 Isoelektrofokussierung der enzymaktiven Fraktionen nach DEAE-Sephadex-Chromatographie in einer pH-Gradienten von pH 5-7
Ordinaten: Proteingehalt in % der Transmission bei 254 nm, die durchgezogene Linie entspricht der pH-Gradienten, Aktivitätsangaben in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat

17 β = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

20 α = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

3.2.5. Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid-Membranen

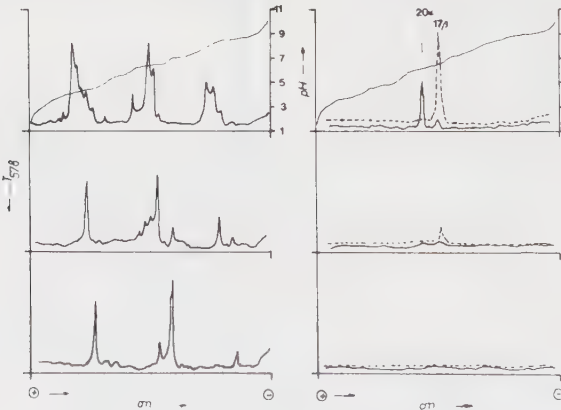


Abb. 8 Densitogramme der durch Isoelektrofokussierung in einer Ampholin pH-Gradienten 3-10 in Polyacrylamid-Gelmembranen aufgetrennten 12 000 x g-Überstände von mit Triton-X-100 behandelten Humanplacenta-Mitochondrien-Fractionen

oben: Außenmembran-Fraktion Mitte: Innenmembran-Fraktion
unten: Matrix

links: Proteinfärbung mit Lichtgrün

rechts: spezifische Anfärbung der Enzymaktivitäten mit Tetrazoliumsalz Einzelheiten siehe Abschnitt 2

Ordinaten: densitometrische Auswertung im Eppendorf Fotometer mit Linearschreiber bei 578 nm

Ausgezogene Linie in den oberen Abbildungen: pH-Gradienten aus den pH-Werten der 0,5 cm breiten Streifen der Gelmembranen über eine Länge von etwa 15 cm

17 β = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

20 α = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Die Abbildung 8 spiegelt die bei der quantitativen Säulenelektrofokussierung im Rahmen der Anreicherung der Enzymaktivitäten erhobenen Befunde gleichermaßen in der Dimension eines analytischen Mikroverfahrens wider. Die durch Elektrofokussierung (pH-Gradienten 3-10) in Polyacrylamid aufgetrennten Proteine der äußeren Mitochondrienwand von Humanplacenta, die nach Behandlung der "Außenmembran" mit Triton-X-100 in den Überstand abgelöst wurden, zeigen nach einem Verfahren der spezifischen Anfärbung der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen mit Tetrazoliumsalz bei etwa pH 6,0 (20 α -Enzym) und etwa pH 6,6 (17 β -Enzym) spezifische Proteinzonen in diesem Elektropherogrammereich. "Innenmembran" und "Matrix" der Humanplacenta-Mitochondrien, die nach dem gleichen Schema behandelt wurden, zeigten keine spezifisch anfärbbaren Proteinbanden.

3.3. Untersuchung der Einflußnahme von Detergentien auf die strukturgebundenen Enzymaktivitäten der Humanplacenta-Mitochondrien

Um die Einflußnahme von Detergentien (Digitonin und Triton-X-100) auf die "strukturgebundenen" Enzymaktivitäten der Mitochondrien von

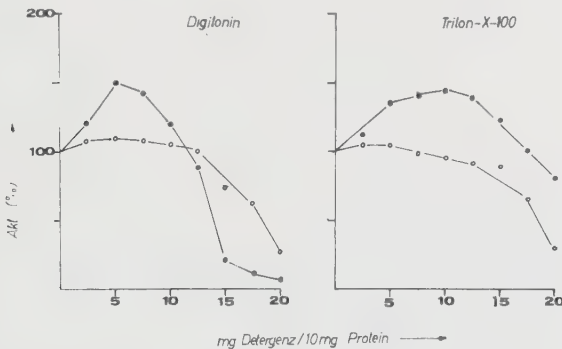


Abb.9 Abhängigkeit der Enzymaktivität gereinigter Humanplacenta-Mitochondrien von der Detergenzkonzentration
Enzymaktivitäten von Original-Mitochondrien gleich 100%
Ordinate: Aktivitätsangaben dargestellt in % der Fraktion, die für den jeweiligen Parameter den höchsten Wert hat

- = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase
- = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Humanplacenta zu charakterisieren, wurden steigende Mengen von Digitonin und Triton-X-100 zu je 10 mg Protein der Mitochondrien-Fraktion zugesetzt und die Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. 9), bezogen auf die unbehandelten Mitochondrien (= 100%). Es zeigte sich, daß für Digitonin bis etwa 5 mg und für Triton-X-100 bis etwa 10 mg eine Aktivitätssteigerung bis zu 50% zu verzeichnen war. Höhere Detergentienkonzentrationen führten zu einer Inaktivierung der Enzymaktivitäten. Es ist denkbar, daß die Aktivitätssteigerung zustande kommt durch eine detergentenbedingte Strukturauflösung der Mitochondrienwand, in der die Struktur- und Enzymproteine über Phospholipotide miteinander verflochten sind, wobei die Strukturauflösung zu einer Vergrößerung der Oberfläche führt und somit zu einer Freisetzung schwer zugänglicher enzymaktiver Innenbezirke. Abbildung 10 zeigt, daß bis zu etwa 10 mg Triton-X-100 pro 10 mg Protein isolierter Außenmembranen von Mitochondrien der Humanplacenta der stärkste Ablöseeffekt von strukturgebundenen Proteinen der Außenmembranen in den Überstand erreicht wird. Gleiches gilt für die im Überstand wiederzufindenden spezifischen Aktivitäten des 17β - und 20α -Enzyms, wobei die Bezugsgröße die Gesamtaktivität der Mitochondrien-Rohfraktion ist.

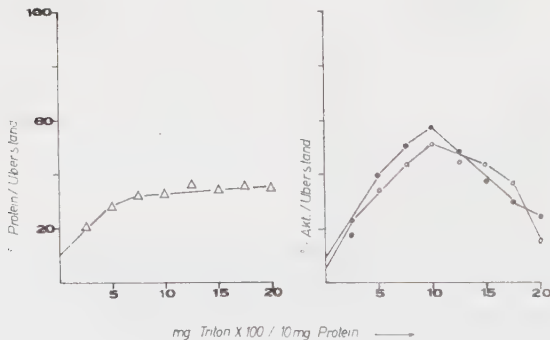


Abb.10 Abhängigkeit der in den 12 000 x g-Überstand abgelösten Proteinmengen bzw. Enzymaktivitäten gereinigter Außenmembran-Fractionen von Humanplacenta-Mitochondrien von der Konzentration von Triton-X-100

Ordinaten: Proteinmenge und Enzymaktivitäten dargestellt in % bezogen auf die Gesamtproteinmenge und die Gesamtenzymaktivität der unbehandelten Außenmembran-Fraktion

○—○ = 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

●—● = 20α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

3.4. Kinetische Untersuchungen mit den solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

3.4.1. Abhängigkeit von der Menge des Enzymproteins

Bis zu einer Menge von 1,25 mg Enzymprotein konnte bei den Inkubationen mit steigenden Proteinmengen eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Enzymmenge und entstandenem Östron aus Östradiol-17 β bzw. Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol aus Progesteron festgestellt werden.

3.4.2. Zeitabhängigkeit

Die Bildung des Östradiol-17 β - bzw. Progesteron-Metaboliten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer verlief bis 30 Minuten wie eine Reaktion nullter Ordnung.

3.4.3. Thermische Inaktivierung

Die thermische Stabilität der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen wurde durch Inkubation der Enzymproteine aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien bei verschiedenen Temperaturen ohne Zusatz von Östradiol-17 β bzw. Progesteron geprüft (Abb. 11). Die Enzymaktivitäten waren gegenüber Temperaturerhöhungen unterschiedlich stabil. Bei 37°C zeigte das 20 α -Enzym etwa 55%, das 17 β -Enzym etwa 20% Aktivitätsverlust.

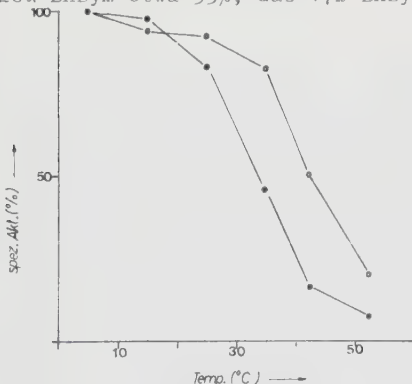


Abb. 11 Abhängigkeit der spezifischen Enzymaktivitäten der aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Enzyme von der Vorinkubation (15 min) bei verschiedenen Temperaturen
Inkubationsbedingungen: 1,0 mg Enzymprotein, 1 mg NAD⁺ bzw. NADH, in Ringer-Phosphat-Puffer für 15 min unter Luftzutritt
Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen
Ordinate: spezifische Aktivität in % des höchsten Einzelwertes

○—○ = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 7,4
(Östradiol-17 β $\longrightarrow$ Östron)
●—● = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 6,0
(Progesteron $\longrightarrow$ Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol)

3.4.4. Temperaturoptimum

Bei steigenden Temperaturen wurden in Gegenwart von Sättigungskonzentrationen von Östradiol-17 β bzw. Progesteron Inkubationen mit jeweils 1 mg Enzymprotein durchgeführt und die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Temperatur gemessen (Abb. 12). Beide Enzymproteine zeigten einen Anstieg der Produktausbeute bis etwa 45 °C.

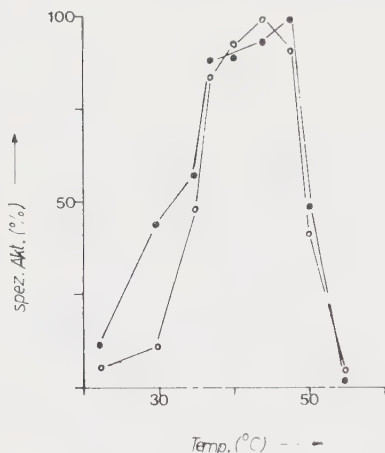


Abb. 12 Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Enzyme der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien von der Temperatur. Inkubationsbedingungen: 1 mg Enzymprotein, 1 mg NAD⁺ bzw. NADH, in Ringer-Phosphat-Puffer für 15 min unter Luftzutritt, 1,1 ml Gesamtkubationslösung. Die Punkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Einzelheiten siehe Abschnitt 2. Ordinate: spezifische Aktivität in % des höchsten Einzelwertes.
 ○—○ = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 7,4 (Östradiol-17 β $\rightarrow$ Östron)
 ●—● = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 6,0 (Progesteron $\rightarrow$ Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol)

3.4.5. pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Oxidations-Reaktion mit den Substraten Östradiol-17 β und Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol bzw. des Hydrierungsschrittes mit den Substraten Östron und Progesteron wurden vier verschiedene Puffersysteme gewählt (Abb. 13): Ringer-Phosphat-Puffer, Tris/HCl, Natriumborat/NaOH und Zitronensäure/Dinatriumhydrogenphosphat. Das pH-Optimum für die Reduktion lag für beide Enzymaktivitäten zwischen pH 6,1 und pH 6,3 und für die Oxidation zwischen pH 9,5 und pH 9,8.

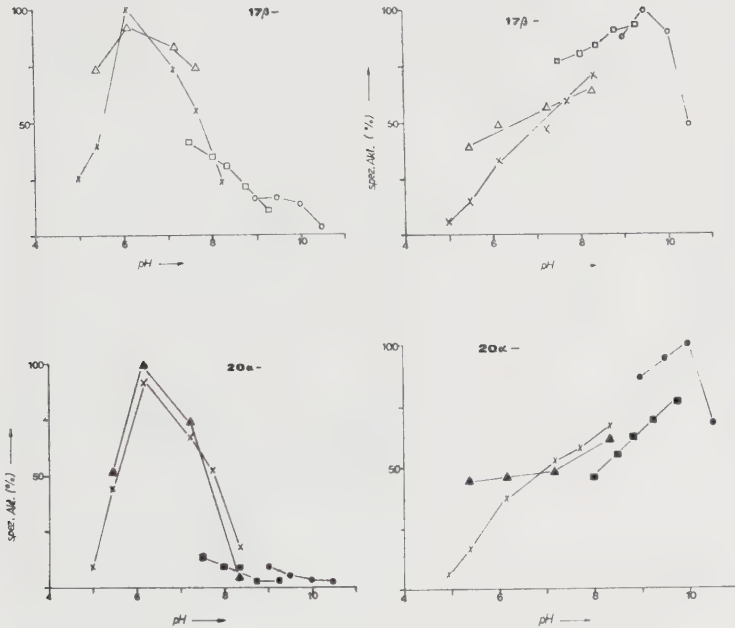


Abb.13 Einfluß verschiedener Puffermedien und pH-Werte auf die spezifischen Aktivitäten der aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17β- und 20α-Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen
 Inkubationsbedingungen: 1 mg Enzymprotein, 1 mg NAD⁺, NADH, NADP⁺ bzw. NADPH, 15 min bei 37°C unter Luftzutritt, Gesamtkubationslösung 4,1 ml

Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen
 Einzelheiten siehe Abschnitt 2

obere Abb.: 17β-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

links: Reduktion von Östron zu Östradiol-17β

rechts: Oxidation von Östradiol-17β zu Östron

untere Abb.: 20α-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

links: Reduktion von Progesteron zu Δ⁴-Pregnen-3-on, 20α-ol

rechts: Oxidation von Δ⁴-Pregnen-3-on, 20α-ol zu Progesteron

X—X Ringer-Phosphat-Puffer

□—□ Tris/HCl

○—○ Natriumborat/NaOH

Δ—Δ Na₂HPO₄/Citronensäure

2.4.6. Untersuchungen zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des 17 β - und 20 α -Enzyms

Der Einfluß von steigenden Mg-Tonen-Konzentrationen auf die Aktivität des 17 β - und 20 α -Enzyms war analog (Abb.14). Bis etwa

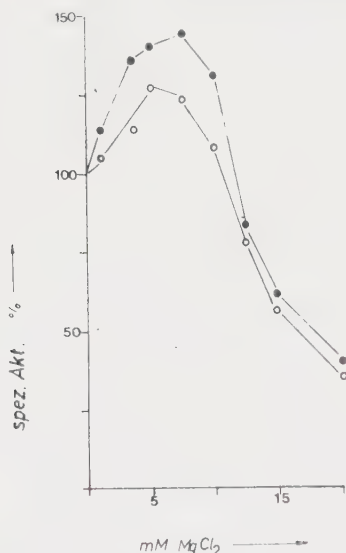


Abb.14 Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der aus der Aufreinigung von Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen von der MgCl₂-Konzentration
 Inkubationsbedingungen: 1 mg Enzymprotein, 1 mg NAD⁺ bzw. NADH, in Na₂HPO₄/Citronensäure für 15 min bei 37°C unter Luftzutritt, Gesamtkubationsvolumen 4,1 ml
 Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen
 Ordinate: % der spezifischen Aktivität (100% = ohne MgCl₂-Zusatz)
 ○—○ = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 7,4 (Östradiol-17 β → Östron)
 ●—● = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 6,0 (Progesteron → Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol)

8 mM MgCl₂ wurde eine Aktivitätssteigerung bis etwa 45% über den Ausgangswert beobachtet. Höhere Konzentrationen zeigten dagegen einen hemmenden Effekt. 5 mM Cu²⁺, 5 mM Zn²⁺ und 5 mM Fe²⁺ hemmten die Enzymaktivitäten vollständig. Ein aktivierender Einfluß von Cystein auf beide Enzymaktivitäten konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl beide Enzyme durch Zusatz typischer SH-Gruppen blockierender Verbindungen wie Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat (10⁻⁴ M) bis zu 55% gehemmt wurden.

3.4.7. Substratspezifität

Eine Übersicht der Substratspezifität der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen gibt die Tabelle 5. Das 17 β -Enzym bevorzugt Ring-A-phenolische Östrogene. Bei äquimolaren Mengen Östradiol-17 β und Testosteron wird 37mal mehr Östradiol-17 β als Testosteron umge-

setzt. Ein Progesteronumsatz in 20-Position ist nicht nachweisbar. Die 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase ist spezifisch für Progesteron. Ring-A-neutrale Anorgene oder phenolische C-18-Östrogene werden unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht metabolisiert.

eingesetztes Steroid	nachgewiesenes Reaktionsprodukt	Coenzym 1 mg. Ansatz	20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase	17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase
100 %				
Östradiol-17 β	Östron	NAD ⁺	1	100
		NADP ⁺	1	72
Östron	Östradiol-17 β	NADH	1	32
		NADPH	1	38
Progesteron	Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol	NADH	100	1
		NADPH	87	1
Testosteron	Androstendion	NAD ⁺	1	2,8
		NADP ⁺	1	1
Androstendion	Testosteron	NADH	1	2,1
		NADPH	1	1

Tab.5 Substratspezifität der solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -hydroxysteroid-Oxidoreduktasen aus der Außenmembran von Humamplacenta-Mitochondrien
Inkubationsbedingungen: 1 mg Enzymprotein, 0,1 μ Ci ¹⁴C-Steroid unter Zusatz von 10 μ Mol nicht radioaktiv markiertem Steroid pro Ansatz, Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 für 15 min bei 37°C unter Luftzutritt, Gesamtkubationsvolumen 4,1 ml
Einzelheiten siehe Abschnitt 2

3.4.8. K_m-Wert-Bestimmung und Coenzymspezifität

In Tabelle 6 sind die K_m-Werte mit den Halbmaximalgeschwindigkeiten für die 20 α - und 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase bei Variabilität der Progesteron- bzw. Östradiol-17 β -Konzentrationen korreliert. Der K_m-Wert für das gereinigte 17 β -Enzym mit Östradiol-17 β als Substrat und NAD⁺ als wasserstoffübertragendem Coenzym beträgt 0,105 mM, für NADP⁺ 0,098 mM. Bei Östronzusatz wird in Form der Lineweaver-Burk-Transformation der Schnittpunkt mit der x-Achse zum Drehpunkt und die Halbmaximalgeschwindigkeit

Substrate	variable Konzentrationen	konstante Konzentrationen	K_m μM	V_{max} $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$
17 β -Enzyme Östradiol-17 β	NAD $^{+}$	0,10		
	Östron	1 mM	0,10	0,6
	Östron	1 mM	0,10	0,08
	Testosteron		0,102	0,01
	Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol		0,100	0,8
Progesteron	NADH	0,18	1,03	
	NADPH	0,10	0,81	
	Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol	1 mM	0,18	0,86
	Östradiol-17 β	10 mM	0,18	0,33
	Testosteron		0,18	1,01
			0,18	1,03

Tab.6 Kinetische Konstanten der gereinigten Mitochondrien-17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

reduziert. Dies entspricht kompetitiven Hemmungsmechanismen (Abb.15).

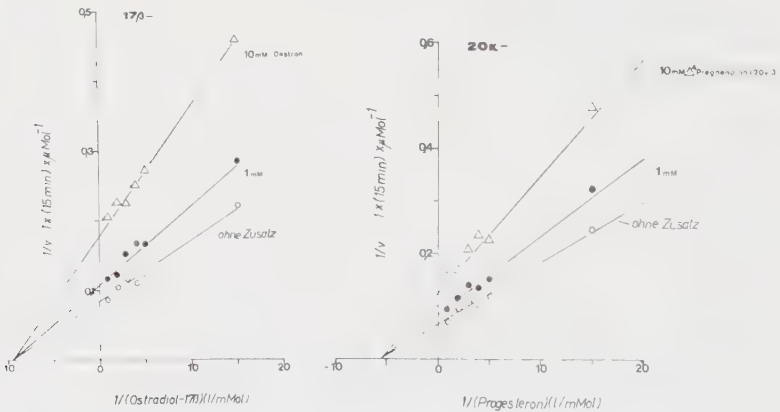


Abb. 15 Bildung von Östron bzw. Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol durch die aus der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration (Östradiol-17 β bzw. Progesteron) und Untersuchung der Inhibitorwirkung der Produkte auf den Substrat-Umsatz

Inkubationsbedingungen siehe Legende zu Abbildung 11
Einzelheiten siehe Abschnitt 2

Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

17 β = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

20 α = 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Testosteron und Δ^4 -Pregnen-3on,20 α -ol haben keinen Einfluß auf den K_m -Wert und die Reaktionsgeschwindigkeit. Der K_m -Wert des 20 α -Enzyms für Progesteron als Substrat und NADH als Coenzym ist 0,18 mM, für NADPH 0,16 mM. Als Kompetitor wirkt Δ^4 -Pregnen-3on,20 α -ol. Östradiol-17 β und Testosteron zeigten keinen Einfluß auf den K_m -Wert und die Reaktionsgeschwindigkeit. Für beide Enzymaktivitäten ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit NAD^+ größer als mit $NADP^+$.

3.5. Einfluß von Phospholipoiden auf die Enzymaktivität

Die in Tabelle 7 zusammengefaßten Befunde zeigen, daß mit Hilfe organischer Lösungsmittel Phospholipide fraktioniert aus den "Außenmembranen" von Humanplacenta-Mitochondrien extrahierbar sind. Die Extraktionen sind mit einem Proteinverlust verbunden, wobei die Proteine, die keine Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivitäten aufweisen, im Waschwasser quantitativ nachweisbar sind. Bemerkenswert ist im Vergleich zu den von Schulze und Staudinger (57) gemachten Beobachtungen bei Rattenleber-Mikrosomen der hohe Sphingomyelingehalt, der in der gleichen Größenordnung von Pol-low et al. (18) in Humanplacenta-Mikrosomen gefunden wurde. Aus der Abbildung 16 geht hervor, daß die Enzymaktivität der aus der äußeren Membran der Humanplacenta-Mitochondrien angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase und der Phospholipidgehalt der Außenmembran miteinander korrelieren. Mit der Abnahme

	Protein (mg/0,1 ml)	Gesamt- Sphingo- Lecithin Phosphatidyl- Phosphatidyl- protein myelin inosit ethanolamin Phosphatidyl- serin (n Äquiv. P/mg Protein)				
		(mg)		(n Äquiv. P/mg Protein)		
native Mitochondrien	1,25	448	123,8	248,3	68,3	121,8
bei -25°C mit Aceton extrahierte Mitochondrien	0,78	178	88,3	144,8	30,7	73,6
mit Aceton/Butanol extrahierte Mitochondrien	0,47	88,7	47,5	28,3	15,8	20,1

Tab.7 Phospholipidgehalt nativer und mit organischen Lösungsmitteln extrahierter Mitochondrien aus der Humanplacenta
Mittelwerte aus drei Bestimmungen
Einzelheiten siehe Abschnitt 2

des Gesamtphosphatidgehalts ist eine Minderung beider Enzymaktivitäten zu verzeichnen.

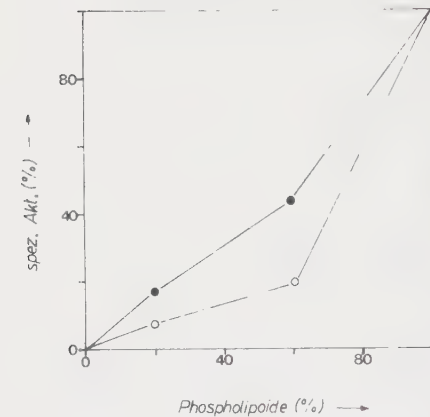


Abb. 16 Einfluß der in der Mitochondrienmembran gebundenen Phospholipide auf die mit der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien assoziierten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

Inkubationsbedingungen: 1 mg Enzymprotein, 1 mg NAD⁺ bzw. NADH in Ringer-Phosphat-Puffer für 15 min bei 37°C unter Luftzutritt, Gesamtkubationsvolumen 4,1 ml

Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Einzelheiten siehe Abschnitt 2

Ordinate: Spezifische Aktivität in % der nicht extrahierten Außenmembranen

Abszisse: Phospholipidgehalt der durch fraktionierte Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erhaltenen Außenmembran-"Reststrukturen" in % (100% = native Außenmembranen)

- = 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 7,4
(Östradiol-17 β $\longrightarrow$ Östron)
●—●= 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, pH 6,0
(Progesteron $\longrightarrow$ Δ^4 -Pregnen-3-on, 20 α -ol)

3.6. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der nach Isoelektrofokussierung (in einer pH-Gradienten von 5-7) erhaltenen Enzymaktivitätsgipfel (17 β - und 20 α -Enzym) wurden durch Gelfiltration an BioGel in Verbindung mit Eichproteinen ermittelt (Abb. 17). Für das 17 β -Enzym ergab sich ein Molekulargewicht von 144 000, für die 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase von 178 000.

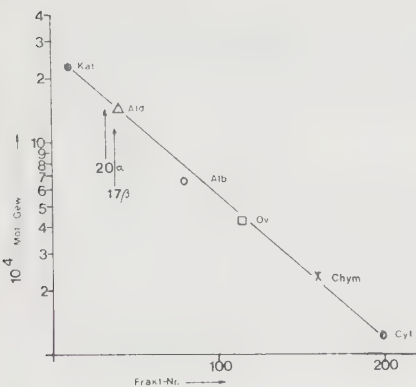


Abb. 17 Molekulargewichtsbestimmung der aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Enzyme durch Gelfiltration an Agarose (BioGel A-0,5 m, 200-400 mesh), Säulenlänge 150 cm, Durchmesser 2 cm, Sammelvolumen 3 ml

Die Eichung der Säule erfolgte mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichts.

Kat=Katalase, Ald=Aldolase, Alb=Albumin, Ov=Ovalbumin, Chym=Chymotrypsinogen, Cyt=Cytochrom

17 β = 17 β -Enzym

20 α = 20 α -Enzym

3.7. Untersuchungen zum Wasserstofftransfer zwischen der 17-Position von Östradiol-17 β und der 20-Position von Progesteron

In Tabelle 8 sind die Wasserstofftransfer-Eigenschaften verschiedener Enzympräparationen der Humanplacenta-Mitochondrien in bezug auf den Wasserstoffübergang von der 17-Position von Östradiol-17 β auf die 20-Position von Progesteron zusammengefaßt. Die aus der "Außenmembran" der Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen bewirken isoliert für sich keinen Wasserstofftransfer. Dagegen sind die intakten Mitochondrien, die nach der Methode von Schnaitman (28) isolierten Außenmembranen der Mitochondrien und die freien isolierten Einzelenzyme nach Rekombination durch zehnminütige Inkubation in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 bei 37°C in der Lage, eine Wasserstoffübertragung zwischen C-17 von Östradiol-17 β und C-20 von Progesteron in unterschiedlichem Ausmaß zu katalysieren.

Enzympräparation	Wasserstoff-Donator (1 μ Mol/l)	Akzeptor (10 μ Mol/l)	Coenzym (1 mg Ansatz)	nachgewiesenes 3H-markiertes Reaktionsprodukt	% der eingesetzten 3H-Aktivität
gereinigtes 17-Enzym	(17 α - ³ H)-Progesteron	Östradiol-17	NAD NADP		
gereinigtes 20 α -Enzym	"	"	NAD NADP		
intakte Mitochondrien-Membran	"	"	NAD ⁺ NADP ⁺	Δ^4 -Pregnen-3-on-20 α -ol	18,3 11,4
intakte Mitochondrien	"	"	NAD ⁺ NADP ⁺	"	38, 24,6
10 min bei 37°C rekombinierte Enzymaktivitäten	"	"	NAD ⁺ NADP ⁺	"	8,1 2,1

Tab. 8 Ausmaß der durch verschiedene Enzympräparationen katalysierten Wasserstofftransfers zwischen Östradiol-17 β und Progesteron
Einheiten der Inkubationsbedingungen siehe Abschnitt 2

3.7.1. Rekombinationsverhalten der aus der "Außenmembran" von Humanplacenta-Mitochondrien isolierten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

Die Einflüsse von Temperatur und Zeit auf das Rekombinationsverhalten der aus der "Außenmembran" von Humanplacenta-Mitochondrien isolierten und angereicherten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen zu einem assoziativen Komplex zeigt die Abbildung 18. Die Wasserstofftransfer-Eigenschaften nach Rekombination sind denen der intakten Mitochondrien analog, quantitativ jedoch reduziert. Zehnminütige Inkubationen bei 37 °C in Ringer-Phosphat-Puffer hat den stärksten Effekt in bezug auf die Rekombination und die

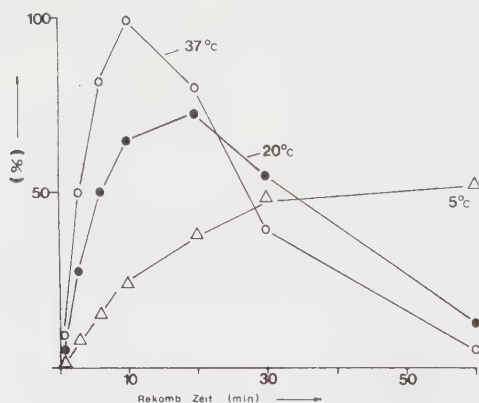


Abb.18 Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Rekombination zweier aus der "Außenmembran" von Humanplacenta-Mitochondrien isolierten und separierten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen, die in der Kombination den spezifischen Wasserstofftransfer zwischen Östradiol-17 β und Progesteron katalysieren

Die verwendeten mitochondrialen 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen wurden durch Isoelektrofokussierung separiert und angereichert. Zur Rekombination wurden die gefriergetrockneten Enzympräparationen in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, gelöst (10 mg/1 ml)

Die gemessene Größe, dargestellt in % der höchsten Aktivität (=100%), ist der Wasserstoffeinbau in μ Mol Östradiol-17 β -Wasserstoff in die 20-Position von Progesteron unter Bildung von Δ^4 -Pregnen-3-on,20 α -ol. Einzelheiten siehe Abschnitt 2

Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen
 Donator-Konzentration: 1 μ Mol (17 α - 3 H)Östradiol-17 β
 Akzeptor-Konzentration: 10 μ Mol Progesteron (inaktiv)

Wiedergewinnung der Wasserstofftransfer-Eigenschaften. Zeitlich darüber hinausgehende Inkubationen führten zu einem steilen Abfall der "Transhydrogenase-Aktivität" des Rekombinationskomplexes.

3.7.2. pH-Wert-Abhängigkeit der "Transhydrogenase-Aktivität"

In Abbildung 19 ist der durch Rekombination der freien aus der "Außenmembran" von Humanplacenta-Mitochondrien isolierten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen bewirkte Wasserstofftransfer zwischen Östradiol-17 β und Progesteron in Abhängigkeit von verschiedenen Puffersystemen und vom pH-Wert dargestellt. Das

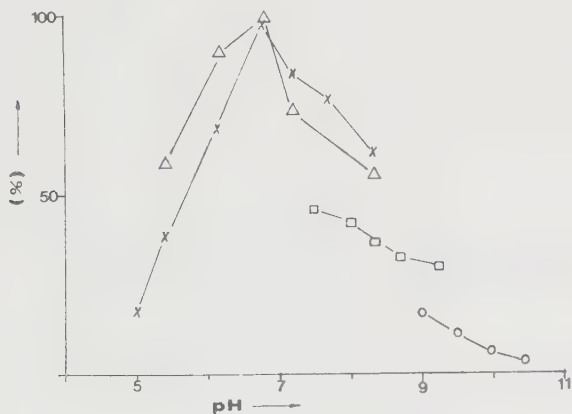


Abb. 19 pH-Wert-Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen Östradiol-17 β und Progesteron, der durch die bei 37°C für 10 min rekombinierten 17 β - und 20 α -Enzymaktivitäten katalysiert wird

Ordinate: % der höchsten Aktivität des jeweiligen Parameters, Wasserstofftransfer zwischen Östradiol-17 β und Progesteron gemessen in μ Mol Östradiol-17 β -Wasserstoff, der auf die 20-Position von Progesteron übertragen wurde.

Die Punkte der Kurvensind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

- $\triangle$ — $\triangle$ = Citronensäure/Na₂HPO₄
- $\times$ — $\times$ = Ringer-Phosphat-Puffer
- $\square$ — $\square$ = Tris/HCl-Puffer
- $\circ$ — $\circ$ = Natriumborat/NaOH

Donator-Konzentration: 1 μ Mol (17 α -³H)Östradiol-17 β

Akzeptor-Konzentration: 10 μ Mol Progesteron (inaktiv)

pH-Optimum liegt bei pH 6,8 und entspricht somit dem von Pol-low und Mitarbeitern (18) festgestellten pH-Optimum der "Transhydrogenase-Aktivitäten" der Mikrosomen-Fraktionen von Human-placenta und anderer Gewebe. Das in den sauren Bereich verschobene pH-Optimum ist als Summationswert zu verstehen, der zustande kommt durch die Konkurrenz zweier Reaktionen: der Oxidation von Östradiol-17 β zu Östron, die ihr pH-Optimum zwischen pH 9 und pH 10 hat und der Reduktion von Progesteron zu Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol, die ihr pH-Optimum zwischen pH 5 und pH 6 hat.

3.7.3. Substratspezifität der "Transhydrogenase-Aktivität"

Die in Tabelle 9 zusammengestellten Untersuchungen zur Substratspezifität in bezug auf den Wasserstoff-Akzeptor zeigen, daß Progesteron bevorzugt wird und in geringem Umfang Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol und 5 α -Pregnandion-3,20 katalysiert werden (Δ^4 -Pregnen-3on, 20 α -ol nach vorheriger Oxidation zu Progesteron). 5 β -konfigurierte Verbindungen sind als Wasserstoff-Akzeptoren nicht wirksam.

Acceptor (10 μ Mol)	Wasserstoff- Donator (1 μ Mol)	nachgewiesenes ³ H-markiertes Reaktionsprodukt	% der eingesetzten H-Aktivität (%)
Progesteron	(17 α - ³ H)Oestradiol-17 β	Δ^4 -Pregnen-20 α -ol, 3-on	18,3
Δ^4 -Pregnen-20 α -ol, 3-on	"	Δ^4 -Pregnen-20 α -ol, 3-on	2,8
5 α -Pregnandion- 3,20	"	5 α -Pregnen-20 α -ol, 3-on	1,7
5 β -Pregnandion- 3,20	"	n. n.	-
5 β -Pregnen-3 α -ol, 20-on	"	n. n.	-
5 β -Pregnen-3-on, 20 α -ol	"	n. n.	-
Δ^4 -Pregnen-11 β ,21-diol, 3,20-dion	"	n. n.	-

Tab. 9: Substratspezifität in bezug auf das Acceptor-Steroid, das den Oestradiol in 17-Position abgespaltenen Wasserstoff fixiert. Einzelheiten der Inkubationsbedingungen vergleiche "Methodik".
n. n. = nicht nachweisbar

4. Diskussion

4.1. Subzelluläre Verteilung der 17 β - und 20 α -Enzyme in der Humanplacenta

Sowohl die cytoplasmatische Phase der Humanplacenta als auch die Mikrosomenfraktion und die Außenmembran der Mitochondrien verfügen über 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivitäten, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen. Dieses Ergebnis bestätigt und ergänzt die Befunde von Engel et al. (58-62), Talalay et al. (63) und Pollow et al. (13), die sich mit der Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung der hochaktiven löslichen cytoplasmatischen 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase der Humanplacenta befaßt haben, und von Little et al. (40,41), die in modifizierter Form das von Engel et al. (62) für das 17 β -Enzym entwickelte Anreicherungsschema auf die cytoplasmatische 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase der Humanplacenta übertragen haben. Von Little et al. (41) ist die Vermutung geäußert worden, daß das cytoplasmatische 20 α -Enzym identisch sei mit der 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, weil mit den verwendeten Aufarbeitungsmethoden eine Separierung beider Enzyme nicht möglich war. Jüngste Befunde von Engel et al. (61) mit einer verbesserten Anreicherungsmethode zeigen aber, daß mit dem hochgereinigten 17 β -Enzym eine Reduktion von Progesteron in 20 α -Hydroxy-Progesteron nicht erfolgt. Außerdem untermauern die vorgelegten Ergebnisse die Befunde von Breuer et al. (64) und Pollow et al. (12) in bezug auf die mikrosomale Verteilung der 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase in Humanplacenta und unterstützen die von Zander et al. (65,66) gemachten Beobachtungen der subzellulären Verteilung der 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase in der Humanplacenta.

Von besonderem Interesse ist der in der vorliegenden Arbeit gemachte Befund der Assoziation von Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen mit der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien. Eine signifikante Beeinträchtigung durch mikrosomale Verunreinigungen oder assoziierte cytoplasmatische Proteine, in denen Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivitäten vorkommen, war durch Leitenzymbestimmungen und durch elektronenoptische Kontrolle der gereinigten Mitochondrien bzw. mitochondralen Subfraktionen weitgehend auszuschließen.

4.2. Solubilisierung, Anreicherung, Separierung und Charakterisierung der mitochondrial gebundenen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen

Die Solubilisierung der gereinigten Außenmembran erfolgte unter Detergentieneinfluß. Die in den Überstand durch Triton-X-100 abgelösten enzymaktiven Proteine wurden anschließend zur **Reinigung** der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen einer Ammoniumsulfatfällung, einer Gelfiltration, einer Ionenaustauschchromatographie und einer Isoelektrofokussierung unterworfen. Die Anreicherungsfaktoren für das 17β - und das 20α -Enzym betrugen 25fach bzw. 29fach, während die Wiederfindungsrate bezogen auf die Mitochondrien-Rohfraktion zwischen 2-3% lag. Zander et al. (65,66), die bei Untersuchungen über die subzelluläre Verteilung der 20α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase in Humanplacenta eine 20α - und 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivität in Mitochondrien nachweisen konnten, beschränkten einen anderen Weg zur Reinigung dieser Enzyme. Von den Autoren wurde die Mitochondrien-Rohfraktion über Sephadex G-100 gereinigt, die enzymaktiven Elutionsfraktionen präzipitiert und durch Ultraschallbehandlung in Phosphat-Puffer zerkleinert. Das so behandelte Material wurde anschließend über eine CM-Cellulose-Säule chromatographiert, wobei sich ergab, daß das 20α -Enzym weniger fest gebunden wurde als das 17β -Enzym und somit eine Separierung beider in der Mitochondrienfraktion gebundenen Enzyme möglich war. Zander et al. (66) nahmen aber keine, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, Subfraktionierung der Mitochondrien vor, sondern gingen von der Mitochondrien-Rohfraktion aus. Die Tatsache, daß die mitochondrial gebundenen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen mit Hilfe von Triton-X-100, einem nicht ionischen Detergenz, aus dem Verband der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien herausgelöst werden können, läßt den Schluß zu, daß die Enzymaktivitäten nur wenig fest an die Membran gebunden sind.

Neben der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Assoziation von Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen der Humanplacenta mit der Außenmembran der Mitochondrien ist von Breuer et al. (67,68) eine Östradiol- 17β -3-Glucuronyltransferase in der Außenmembran von Mitochondrien des Schweinedünndarms und von Shaw et al. (69) und Renwick et al. (70) eine Aromatisierung des A-Ringes von

C-19-Steroiden zu Ring-A-phenolischen C-18-Steroiden in den isolierten Mitochondrien der Humanplacenta festgestellt worden, was darauf hinweist, daß die Mitochondrien in verschiedenen Geweben in einem bisher noch nicht gekannten Ausmaß aktiv am Steroidstoffwechsel beteiligt sind.

Ähnlichkeiten in bezug auf Coenzym- und Substratspezifität der aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien solubilierten und angereicherten 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen gegenüber den in der Cytoplasma-Fraktion (58-63) bzw. "strukturgebundenen" im endoplasmatischen Retikulum (12,18,62) vorkommenden Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen legen die Vermutung nahe, daß es sich um ähnliche, möglicherweise um identische Enzymaktivitäten in verschiedenen Zellkompartimenten handelt. Um eine Aussage über die Identität treffen zu können, bieten sich zwei Möglichkeiten an: einmal der Vergleich enzymkinetischer Parameter und zum anderen der Vergleich der molekularen Struktur der Enzymaktivitäten der einzelnen Zellkompartimente. Beide Wege wurden in der vorliegenden Arbeit beschritten. Die Ergebnisse zeigen, daß die 17 β - und 20 α -Enzympräparationen aus der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien ähnliche enzymkinetische Eigenschaften besitzen wie die von verschiedenen Autoren (58-63) charakterisierten 17 β - und 20 α -Enzymaktivitäten der Cytoplasmafraktion und wie die in der Mikrosomen-Fraktion lokalisierte 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (64). Auffällig sind folgende Übereinstimmungen:

- a) Die mitochondrial gebundenen Enzymaktivitäten sind durch Mg^{2+} -Ionen-Zusatz aktivierbar.
- b) Sie besitzen im "aktiven Zentrum" funktionelle SH-Gruppen. Durch spezifische SH-Gruppen-Blockierung ist ein Absinken der Enzymaktivitäten zu verzeichnen.
- c) Cu^{2+} -, Zn^{2+} - und Fe^{2+} -Ionen üben einen hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivitäten aus.
- d) Die pH-Optima bei den Oxidationsschritten bzw. bei der Hydrierungsreaktion und das Verhalten gegenüber verschiedenen Puffersystemen sind den Enzympräparationen aus der Cytoplasma- bzw. Mikrosomen-Fraktion entsprechend.

e) Beide mitochondrial gebundenen Enzymaktivitäten benötigen Pyridinnukleotide als wasserstoffübertragende Coenzyme, wobei NAD^+ gegenüber NADP^+ bevorzugt wird, eine Beobachtung, die von Breuer et al. (64) bei der Charakterisierung der mikrosomal gebundenen 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase der Humanplacenta ebenfalls gemacht wurde.

f) Ein Vergleich mit den K_m -Werten der cytoplasmatischen und mikrosomalen Enzympräparationen des 17 β - und 20 α -Enzyms zeigt, daß die K_m -Werte der mitochondrial gebundenen Enzymaktivitäten um eine Größenordnung höher liegen. Die Verschiebung der K_m -Werte in den Bereich geringerer "Substratspezifität" ist möglicherweise bedingt durch die Manipulationen beim Solubilisieren und Anreichern der ursprünglich in der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien fixierten Enzymaktivitäten. Nicht auszuschließen sind aktivierende Einflüsse von Umgebungsstrukturen, mit denen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Enzymaktivitäten in der Mitochondrienmembran verflochten sind. Gestützt wird diese Vermutung durch das Ergebnis, daß der Phospholipid-Entzug aus der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien korreliert ist mit einer Abnahme der Enzymaktivitäten der 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen (Abb. 16). Eine Aktivator-Funktion von am Membranaufbau beteiligten Phospholipiden ist von Pollow et al. (18) für die mikrosomal gebundene 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase der Humanplacenta ebenfalls beschrieben worden und für andere Enzymaktivitäten durch Versuche anderer Autoren bekannt (57,71).

g) In bezug auf die durch Gelfiltration bestimmten Molekulargewichte zeigt sich, daß die in der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien gebundenen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen höher molekular sind als das lösliche cytoplasmatische von Engel et al. (61) ausführlich beschriebene 17 β -Enzym, dessen Molekulargewicht mit etwa 68 000 angegeben wird. Die Molekulargewichte der mitochondrialen Enzymaktivitäten entsprechen ungefähr dem Drei- bis Vierfachen, was bedingt sein kann entweder durch eine originäre Andersartigkeit im molekularen Aufbau der mitochondrialen Enzymaktivitäten oder durch Aggregation einer für alle subzellulären Fraktionen typischen monomeren Grundeinheit zu einer höher molekularen Struktur oder durch Assoziation dieses Grundbausteins mit nicht enzymaktiven Begleitsubstanzen (Strukturproteine, Phospho-

lipide). Assoziative Eigenschaften des 17 β -Enzyms der Cytoplasma-Fraktion (63) mit der Folge der Bildung von Di- bzw. Trimeren aus einer monomeren Grundeinheit sind bekannt.

h) Ein Vergleich der isoelektrischen Punkte zwischen dem cytoplasmatischen und dem aus der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und angereicherten 17 β -Enzym zeigt, daß das mitochondriale mit einem pH-Wert von 6,6 dem isoelektrischen Punkt des cytoplasmatischen von pH 6,4 (12) nahekommt. Der Bezug zu den isoelektrischen Punkten (pH 7,3 und 5,8) der in der Mikrosomen-Fraktion gebundenen 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen ist nur mit Vorbehalt möglich (18), da die Solubilisierungs- und Anreicherungsmaßnahmen auf der Herauslösung der Phospholipide mit Hilfe organischer Lösungsmittel basierte, also im Vergleich zum Anreicherungsverfahren der mitochondrialen 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase eine grobe, mit der Möglichkeit der Artefaktbildung belastete Methode darstellt. Zusammenfassend kann festgestellt werden:

Die Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen verteilen sich ubiquitär in den subzellulären Kompartimenten der Humanplacenta. Sie sind fixiert im endoplasmatischen Retikulum, assoziiert mit der Außenmembran der Mitochondrien und in der Cytoplasma-Fraktion vorhanden. Die kinetischen Eigenschaften der untersuchten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in den verschiedenen subzellulären Fraktionen sind ähnlich, was zu der spekulativen Annahme verleitet, daß die Fixation in Membranen keinen Einfluß auf die Eigenschaften und Funktionen der "aktiven Zentren" hat. In Anbetracht der Ähnlichkeit der enzymkinetischen Parameter der "löslichen" und der "strukturgebundenen" Enzyme liegt die Vermutung nahe, daß die Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen im endoplasmatischen Retikulum gebildet und anschließend in die Cytoplasma-Fraktion entlassen oder in die Mitochondrienwand eingebaut werden.

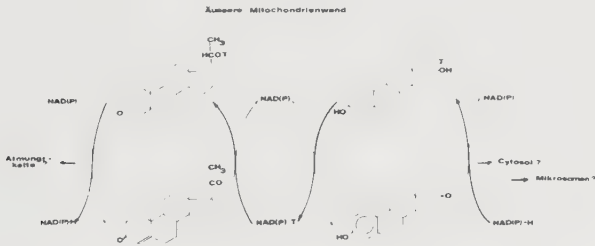
4.4. Zur Frage der biologischen Bedeutung des Wasserstofftransfers zwischen C-17 von Östradiol-17 β und C-20 von Progesteron in verschiedenen Enzympräparationen der Humanplacenta-Mitochondrien

Wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu den Wasserstofftransfer-Eigenschaften verschiedener Enzympräparationen der Human-

placenta-Mitochondrien zeigen, sind nur die intakten Mitochondrien, die nach der Methode von Schnaitman isolierten Außenmembranen der Mitochondrien und die freien isolierten Einzelenzyme nach Rekombination durch 10minütige Inkubation in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, bei 37 °C in der Lage, eine Wasserstoffübertragung zwischen C-17 von Östradiol-17 β und C-20 von Progesteron in unterschiedlichem Ausmaß zu katalysieren. Dagegen bewirken die aus der "Außenmembran" der Humanplacenta-Mitochondrien solubilisierten und durch Aussalzung, säulenchromatographische und isoelektrophoretische Trennverfahren isolierten und angereicherten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen isoliert für sich keinen Wasserstofftransfer zwischen Östradiol-17 β und Progesteron. Denkbar ist, daß die unterschiedlich konfigurierten Sexualhormone in Verbindung mit den mit der Außenmembran der Humanplacenta-Mitochondrien assoziativ verflochtenen, streng substrat- und positionsspezifisch arbeitenden Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen eine in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisierte Wasserstoffüberträger-Brücke bilden, die Wasserstoff transferieren kann, z. B. zwischen den im cytoplasmatischen Sammelbecken vorhandenen Pyridinnukleotiden und denen, die intramitochondrial lokalisiert sind, zumal die Mitochondrienwand - vor allem die "innere Grenzmembran" - für polare Substanzen nicht durchgängig ist.

Eine zweite Möglichkeit wäre, da der Wasserstofftransfer sowohl mit NAD^+ als auch mit NADP^+ wirkungsvoll abläuft, daß die steroidabhängige Wasserstoffüberträger-Brücke, ähnlich wie die von Williams-Ashman und Talalay (63) an einem anderen Enzymsystem erarbeitete "Transhydrogenase-Funktion" der Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen, eine Verschiebung von Wasserstoff zwischen NAD^+ auf der einen und NADP^+ auf der anderen Seite bewirkt. Nachfolgend ist der mit dem Wirkungsmechanismus der Steroidhormone in Zusammenhang gebrachte Wasserstofftransfer in seinen diskutierten Möglichkeiten schematisch dargestellt.

Die Klärung der Frage, ob der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Wasserstofftransfer in der Außenmembran von Humanplacenta-Mitochondrien ein auf dieses Organ beschränktes Phänomen ist oder auch für andere hormonproduzierende bzw. hormonabhängige Gewebe von Bedeutung ist, wird zukünftiger Arbeiten bedürfen. Grundsätzlich ist der Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen als Phänomen von Pollock und Mitarbeitern (11-18) in anderen Organen (Rattenleber, -ovarien und -placenta) - unterschiedlich subzellulär verteilt - nachgewiesen worden.



5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen der Humanplacenta beschrieben.

Durch Differentialzentrifugation wurden folgende subzelluläre Fraktionen der Humanplacenta hergestellt: Cytoplasma-Fraktion, Mitochondrien, rauhe und glatte Mikrosomen, Kerne, Lysosomen und Peroxisomen. Der Reinheitsgrad wurde elektronenoptisch kontrolliert und durch Leitenzymbestimmungen charakterisiert. Mit Ausnahme der Kernfraktion zeigten alle übrigen subzellulären Strukturen 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase-Aktivitäten. Die durch eine lineare Ficoll-Gradienten über einen Zonallauf gereinigten Mitochondrien wurden subfraktioniert: einmal nach dem von Schnaitman et al. beschriebenen Verfahren der Digitonin-Behandlung und zweitens durch osmotischen Schock nach Inkubation der Mitochondrien in hypotonem Phosphat-Puffer. Es zeigte sich, daß die 17 β - und 20 α -Enzymaktivitäten sich wie das Leitenzym der Außenmembran der Mitochondrien, die Monoaminoxidase, verteilen. Die mitochondrialen Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen wurden durch Triton-X-100-Behandlung solubilisiert und durch Ammoniumsulfat-fällung, Gelfiltration über BioGel A-0,5 m, DEAE-Sephadex-Chromatographie und Isoelektrofokussierung angereichert und separiert. Die Anreicherungsfaktoren für die mitochondriale 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase und für das 20 α -Enzym betrugen 25 bzw. 29.

Die enzymkinetischen Untersuchungen mit den angereicherten Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen ergaben den K_m -Wert für das 17 β -Enzym mit Östradiol-17 β als Substrat von $1,05 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, für das 20 α -Enzym mit Progesteron als Substrat $1,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Die Enzyme katalysieren streng substratspezifisch.

Hinsichtlich des Einflusses von Metallionen, Sulfhydrylreagenzien, der Temperatur, der Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen, von Pyridinnukleotiden als wasserstoffübertragende Coenzyme sowie verschiedener Puffermedien und pH-Werte verhalten sich die solubilisierten mitochondrialen Enzymaktivitäten ähnlich wie die aus der Cytoplasma-Fraktion von Humanplacenta isolierten und im endoplasmatischen Retikulum beschriebenen 17 β - und 20 α -

Enzyme. Fraktionierte Extraktionen der Phospholipide aus der Mitochondrienmembran mit organischen Lösungsmitteln hatten eine Abnahme der Enzymaktivität zur Folge. Die durch Gelfiltration gewonnenen Molekulargewichte des 17β - und des 20α -Enzyms wurden mit 144 000 und 178 000 bestimmt.

Die isolierten 17β - und 20α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen zeigen für sich allein keinen Wasserstofftransfer zwischen C-17 von Östradiol- 17β und C-20 von Progesteron. Dagegen sind intakte Mitochondrien, mit der Digitonin-Methode isoliert dargestellte Außenmembranen von Mitochondrien und die durch Vorinkubation in Phosphat-Puffer zu einer integrierten Struktur rekombinierten 17β - und 20α -Enzymaktivitäten imstande, einen Wasserstofftransfer zwischen Östradiol- 17β und Progesteron zu katalysieren. Es wird der Einfluß von Temperatur und Zeit auf das Rekombinationsverhalten beider angereicherten und separierten mitochondrialen Enzymaktivitäten beschrieben und das pH-Optimum der Wasserstofftransfer-Reaktion festgestellt.

Abschließend wird der Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen als eine mögliche "Spielart" des Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen diskutiert: Steroidhormone fungieren als wasserstoffübertragende Coenzyme im Rahmen von Wasserstoffüberträgerketten, die z. B. Wasserstoff transferieren zwischen der Cytoplasma-Fraktion und dem Mitochondrien-Innenraum unter dem Aspekt, daß polare Substanzen die Mitochondrienwand - vor allem die innere Grenzmembran - nicht passieren können.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Koshland, D.E. (1959) J. cell. comp. Physiol., 54, 245
- 2) Tomkins, G.M., Yierlding, K.L. und Curran, J. (1961)
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 47, 270
- 3) Knox, W.E., Auerbach, V.H. und Lin, E.C. (1956) Physiol.
Rev., 36, 164
- 4) Knox, W.E. und Auerbach, V.H. (1955) J. Biol. Chem., 214, 307
- 5) Jensen, E.V. und Desombre, E.R. (1972) Annual Review of
Biochemistry, 41, 203
- 6) Means, A.R. und O'Malley, B.W. (1972) Metabolism, 21, 357
- 7) Kroeger, H. (1963) Nature (Lond.), 200, 1234
- 8) Fataley, P. und Williams-Ashman, H.G. (1960) Recent Progr.
Hormon Res, 16, 1
- 9) Fataley, P. und Williams-Ashman, H.G. (1958) Proc. nat.
Acad. Sci. (Wash.), 44, 15
- 10) Williams-Ashman, H.G. (1964) Cellular Control Mechanisms
and Cancer, Amsterdam
- 11) Pollow, K. (1970) Dissertation, Freie Universität Berlin
- 12) Pollow, K., Pollow, B. und Wenzel, M. (1970) Hoppe Seyler's
Z. Physiol. Chem., 351, 547-562
- 13) Pollow, K. und Pollow, B. (1971) Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 352, 547-562
- 14) Pollow, K., Sokolowski, G. und Pollow, B. (1972) Hoppe Sey-
ler's Z. Physiol. Chem. 353, 43-52
- 15) Pollow, K. und Pollow, B. (1972) Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 353, 53-64
- 16) Pollow, K., Sokolowski, G. und Pollow, B. (1972) Hoppe Sey-
ler's Z. Physiol. Chem. 353, 1094-1098
- 17) Pollow, K. und Pollow, B. (1972) Z. Naturforschung, 27b, 981-988
- 18) Pollow, K., Runge, W., Pollow, B., Grunz, H., Willems, W.R.
u. Schmalbeck, J. (1973) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.
354, 705-721
- 19) Wenzel, M., Pollow, K. und Ziebarth, T. (1967) Z. Naturfor-
schung 22, 894
- 20) Wenzel, M. und Pollow, K. (1967) Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 348, 1667
- 21) Wenzel, M. und Pollow, K. (1968) Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 349, 1357

- 22) Wenzel, M. und Pollow, K. (1968) *Advances in Biosciences* 3, Pergamon Press, Vieweg
- 23) Pollow, K., Pollow, B. und Wenzel, M. (1970) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 547
- 24) Purdy, R.H., Halla, M. und Little, B. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 89, 557-560
- 25) Brown, D.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* (Amsterdam) 162, 152-153
- 26) Dallner, G., Siekevitz, P. und Palade, G.E. (1966) *J. Cell. Biol.* 30, 73-96, 97-117
- 27) Wilson, M.A. und Cascarano, J. (1972) *Biochem. J.* 129, 209-218
- 28) Schnaitman, C., Erwin, V.G. und Greenawalt, J.W. (1967) *J. Cell. Biol.* 32, 719-735
- 29) Chan, T.L., Greenawalt, J.W. und Pedersen, P.L. (1970) *J. Cell. Biol.* 45, 291-305
- 30) Whereat, A.F., Orishoma, M.W., Nelson, J. und Philips, S.J. (1969) *J. Biol. Chemistry* 244, 6498-6506
- 31) Parsons, D.F., Williams, G.R., Thompson, W., Wilson, D. und Chance, B. in: Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E.C. und Tager, J.M. *Mitochondrial structure and Compartment.*, p. 29 Adriatica Editrice, Bari 1967
- 32) Vesterberg, O. und Svensson, H. (1966) *Acta Chem. Scand.* 20, 820-834
- 33) Righetti, P. und Drysdale, J.W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 236, 17-28
- 34) Loening, U.E. (1967) *Biochem. J.* 102, 251-257
- 35) Awdeh, Z.L. (1969) *Science Tools* 16, 42-43
- 36) Peacock, A.C. u. Dingman, C.W. (1967) *Science Tools* 6, 1818-1822
- 37) Catsimpoolas, N. (1968) *Anal. Biochem.* 26, 480-482
- 38) Awdeh, Z.L., Williamson, A.R. und Asconas, B.A. (1968) *Nature* (London) 219, 66-67
- 39) Davies, J., Davenport, G.R., Norris, J.L. und Rennie, P.I.C. (1966) *Endocrinology* 78, 667-671
- 40) Billiar, R.B., Tanaka, Y. Knappenberger, M., Hernandez, R. und Little, B. (1969) *Endocrinology* 78, 667-671
- 41) Billiar, R.B. und Little, B. (1971) *Endocrinology* 88, 263-267
- 42) Bücher, T., Lutz, W. und Pelle, D. (1964) *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. physiol. u. path.-chem. Anal.*, 10. Aufl., 6A, 292

- 43) Omura, T. und Takesue, S. (1970) J. Biochem. 67, 249-257
- 44) Arrigoni, O. und Singer, T.P. (1962) Nature (London) 193, 1256-1258
- 45) Mahler, H.R., Hübscher, G. und Baum, H. (1955) J. Biol. Chem. 216, 625-641
- 46) Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P. Coffey, J.W., Fowler, S. und de Duve, C. (1968) J. Cell. Biol. 37, 482-513
- 47) Schnaitman, C. und Greenawalt, J.W. (1968) J. Cell. Biol. 38, 158-175
- 48) Bergmeyer, H.U. (1962) Weinheim, Method. d. enzym. Analyse, S. 752 bzw. 875, Verlag Chemie
- 49) Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315-323
- 50) Ceriotti, G. (1955) J. Biol. Chem. 214, 59-70
- 51) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 52) Beisenherz, G., Boltze, H., Büchner, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pleiderer, G. (1953) Z. Naturforschung 8b, 555-577
- 53) Karnovsky, M.J. (1956) J. Cell. Biol. 27, 137A-138A
- 54) Spurr, A.R. (1969) J. Ultrastruct. Res., 26, 31-43
- 55) Polch, J., Lees, M. u. Sloane-Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509
- 56) Bartlett, G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466-468
- 57) Schulze, H.-U. und Staudinger, H. (1971) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1659-1674
- 58) Langer, L.J. und Engel, L.L. (1958) J. Biol. Chem. 233, 583-588
- 59) Langer, L.J., Alexander, J.A. und Engel, L.L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2609-2614
- 60) Karavolas, H.J. und Engel, L.L. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3454-3456
- 61) Karavolas, H.J. und Engel, L.L. (1971) Endocrinology 88, 1165-1169
- 62) Karavolas, H.J., Baedeker, M.L. und Engel, L.L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4948-4952
- 63) Jarabak, J., Adams, J.A., Williams-Ashman, H.G. und Tala-lay, P. (1962) J. Biol. Chem. 237, 345-357
- 64) Lehmann, W.D. und Breuer, H. (1967) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1633-1539

- 65) Zander, J., Holzmann, K., v. Münstermann, A.M., Runnebaum, B. und Sieber, W. (1969) "The foeto-placental unit", Pecile, A. and Finzi, C., Milano, Italien, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam
- 66) Zander, J. (1965) Proceedings, II. Congress of Endocrinology, London, 1964, 715-720, Editor: Selwyn Taylor ICS 83, Excerpta Medica, Amsterdam
- 67) Schumacher, R., Rao, G.S., Rao, M.L. und Breuer, H. (1972) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1784-1788
- 68) Rao, G.S., Schumacher, R., Rao, M.L. und Breuer, H. (1972) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1789-1797
- 69) Shaw, D.A., Dalziel, E.M. und O'Donnel, V.J. (1969) Biochem. J. 113, 737-739
- 70) Rewick, A.G.C. und Oliver, J.F. (1973) Steroids 22:1, 123-132
- 71) Duttera, S.M., Byrne, W.L. und Ganoza, M.C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2216-2228
- 72) Hagerman, D.D. (1969) Archives of Biochemistry and Biophysics 134, 196-206
- 73) Ernster, L. und Kuylenstierna, B. (1969) FEBS-Sympos. 17, 5

Lebenslauf

8. September 1947

geboren in Berlin. Meine Eltern sind der Versicherungskaufmann Heinz Sokolowski und seine Ehefrau Ilse, geborene Regenstein.

1967

Reifeprüfung am Carl-Friedrich-von-Siemens-Gymnasium in Berlin

SS 1967

Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin

23. Februar 1973

Staatsexamen

Januar 1971 bis April 1973

Anfertigung der Dissertation im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin in der Arbeitsgruppe Sexualhormonforschung (Dr. Kunhard Pollow)

Mai bis August 1973

Medizinalassistent an der Pathologischen Abteilung des Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhauses (Prof. Dr. Stein)

September bis Dezember 1973

Medizinalassistent an der Medizinischen Klinik des Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhauses (Prof. Dr. Hochrein)

Januar bis April 1974

Medizinalassistent an der Chirurgischen Abteilung des Städt. Humboldt-Krankenhauses (Dr. Hartkopf)

